



Efeito do envelhecimento na resposta *in vitro* de mitocôndrias hepáticas à disfunção induzida por salicilato

Dissertação apresentada com vista à obtenção do 2º ciclo em Actividade Física para a Terceira Idade, da Faculdade de Desporto da Universidade do Porto ao abrigo do Decreto de Lei nº.74/2006 de 24 de Março

Orientadores: Prof. Doutor José Oliveira e Prof. Doutor António Ascensão
Autora: Célia Carmo Machado

Porto, Maio 2012

Ficha de catalogação

Machado, Célia C. (2012). *Efeito do envelhecimento na resposta in vitro de mitocôndrias hepáticas à disfunção por salicilato*. Porto: C. C. Machado. Dissertação de Mestrado em Atividade Física para a Terceira Idade apresentada à Faculdade de Desporto da Universidade do Porto.

Palavras-Chave: BIOENERGÉTICA MITOCONDRIAL, SALICILATO, ENVELHECIMENTO, TOXIDADE HEPÁTICA

Este trabalho foi elaborado no âmbito do projeto PTDC/DES/113580/2009 financiado pela Fundação para a Ciência e Tecnologia e com o apoio do Centro de Investigação em Atividade Física Saúde e Lazer Unidade I&D.



Agradecimentos

A realização deste trabalho só foi possível graças ao apoio e disponibilidade de diversas pessoas que, de forma direta ou indireta, me auxiliaram ao longo deste percurso, pelo que não podia deixar de salientar o meu reconhecimento e expressar os meus sinceros agradecimentos.

Aos meus orientadores, Prof. Prof. Dr. José Oliveira e ao Dr. António Ascensão pela partilha de conhecimentos, disponibilidade e apoio sempre presentes.

À equipa de laboratório, Inês Aleixo, Inês Gonçalves e Sílvia Rodrigues, pelo ensino das técnicas de laboratório e pelo apoio nos momentos mais difíceis da realização escrita deste documento.

À minha colega de escola Ana Sofia Santos pelo apoio prestado na formatação deste trabalho.

À Olinda Silva e à Ana Sousa, que entraram comigo nesta caminhada, pela amizade e incentivo ao longo deste percurso.

À minha família e amigos pelo apoio e incentivo, sempre presentes, na realização deste trabalho.

Índice Geral

Agradecimentos	III
Índice Geral	V
Lista de abreviaturas e símbolos	VII
Resumo	IX
Abstract	XI
1. Introdução	1
2. Revisão da Literatura	3
2.1 Características clássicas da bioenergética mitocondrial	3
2.1.1 A mitocôndria	3
2.1.2 A produção de energia pela mitocôndria	4
2.1.3. O Equilíbrio redox e a produção de radicais e de espécies reativas .	5
2.1.4. Controlo da homeostasia do cálcio	7
2.1.5. Morte celular por apoptose	8
2.2 O papel da mitocôndria na função hepática e na doença	10
2.2.1 A mitocôndria na funcionalidade hepática	10
2.2.2. As doenças hepáticas	12
2.2.3. NASH	13
2.2.3.1 Obesidade	15
2.2.3.2 Frutose	16
2.2.3.3 Dieta rica em Colina	18
2.2.3.4 Danos hepáticos induzidos por drogas	19
2.3 Alterações morfológicas, metabólicas e funcionais do fígado induzidas pela condição do envelhecimento	20
2.4 Agravamento do Envelhecimento induzido pelos marcadores relacionados com a saúde	22
2.5 Doenças mitocondriais induzidas pelo envelhecimento	23
2.6 Toxicidade hepática no envelhecimento induzida por drogas	24
2.7 Doenças nas mitocôndrias hepáticas induzidas pelo Salicilato	27
3. Objetivos	31
3.1. Objetivo geral	31

3.2. Objetivos específicos	31
4. Metodologia.....	33
4.1. Caraterização da Amostra	33
4.2. Protocolo Experimental.....	33
4.2.1. Sacrifício dos animais, extrações do plasma e do fígado.....	33
4.2.2. Isolamento de mitocôndrias hepáticas	33
4.2.3. Funcionalidade respiratória	34
4.2.4 Determinação do potencial elétrico transmembranar ($\Delta\Psi$)	35
4.2.5 Determinação do <i>swelling</i> mitocondrial durante a indução PPT	36
4.3. Procedimentos estatísticos	36
5. Resultados	39
6. Discussão dos resultados.....	43
7. Conclusão	49

Lista de abreviaturas e símbolos

AGL	Ácidos gordos livres
ANT	Translocador de nucleótidos de adenina
ATP	Adenosina trifosfato
CA²⁺	Ião cálcio
CPT1	Carnitinapalmitoil transferase 1
CRm	Cadeia respiratória mitocondrial
CTE	Cadeia transportadora de eletrões
Cu/ZnSOD	Isoforma citosólica da superóxido dismutase
DNAMit	Ácido desoxirribonucleico mitocondrial
EROS	Espécies reativas de oxigénio
ERONS	Espécies reativas de oxigénio e nitrogénio
GPx	Glutathione peroxidase
GSH	Glutathione reduzida
H₂O	Água
H₂O₂	Peróxido de hidrogénio
MnSOD	Isoforma mitocondrial da superóxido dismutase
Na⁺	Ião sódio
NASH	Esteatose hepática não alcoólica
O₂	Oxigénio
O₂^{•-}	Ião superóxido
OH[•]	Radical hidroxilo
ONOO⁻	Peroxinitrito
PTP	Poros de permeabilidade transitória
RE	Retículo endoplasmático

RyR	Recetor de rianodina
SO	Stress oxidativo
SOD	Superóxido dismutase
TNF-α	Fator de necrose tumoral
UCP	Proteínas desacopladoras
VLDL	Lipoproteínas de baixa densidade
$\Delta\Psi_m$	Potencial eletroquímico de membrana

Resumo

A disfunção hepática é comum em pessoas idosas. Este facto tem sido associado a um aumento da suscetibilidade de lesão dos hepatócitos e ao uso habitual de medicamentos, alguns dos quais hepatotóxicos por via mitocondrial. O salicilato, principal metabolito da aspirina pode originar esteatose microvesicular, estando na origem das lesões hepáticas

O objetivo fundamental do presente estudo foi a análise do efeito do envelhecimento na resposta mitocondrial hepática *in vitro* à disfunção induzida por salicilato. Nesse sentido, foram isoladas mitocôndrias de fígado de ratos *Wistar* macho (6 adultos; 19 semanas e 5 idosos; 106 semanas) e avaliadas, *in vitro*, na presença e na ausência do salicilato, a taxa de consumo de oxigénio mitocondrial, o potencial transmembranar ($\Delta\Psi$) e a susceptibilidade mitocondrial à abertura do poro de permeabilidade transitória.

A incubação das mitocôndrias hepáticas de ambos os grupos com salicilato aumentou a taxa de consumo de oxigénio em estado 2 e causou uma diminuição do índice de controlo respiratório. O salicilato afetou igualmente o $\Delta\Psi_m$ máximo, assim como as flutuações associadas ao ciclo fosforilativo (despolarização e repolarização) em ambos os grupos. Na ausência de salicilato, a *lag phase* do grupo envelhecido aumenta relativamente ao grupo adulto, diminuindo no grupo de animais idosos na presença do fármaco. Não se verificaram alterações significativas na amplitude do *swelling* mitocondrial observando-se, no entanto, um ligeiro aumento no grupo envelhecido, na presença do salicilato.

Os resultados demonstram que o salicilato tem efeitos prejudiciais na funcionalidade mitocondrial levando ao desacoplamento da fosforilação oxidativa; contrariamente ao esperado, as mitocôndrias hepáticas dos animais do grupo envelhecido apresentam uma maior eficácia fosforilativa (avaliada pela *lag phase*) na presença de salicilato comparativamente ao grupo adulto.

Palavras-Chave: BIOENERGÉTICA MITOCONDRIAL, SALICILATO, ENVELHECIMENTO, TOXIDADE HEPÁTICA

Abstract

Liver dysfunction is common in older people. This has been associated with increased susceptibility to damage to the hepatocytes and with the use of drugs, some of which by mitochondrial hepatotoxic. Salicylate, the major metabolite of aspirin, may lead to microvesicular steatosis, being at the origin of the hepatic lesions.

Therefore, the primary objective of this study was to analyze the effect of aging on liver mitochondrial response to salicylate-induced dysfunction. To this effect liver mitochondria were isolated from male Wistar rats with (6 adult; 19 weeks and 5 aged; 106 weeks). Rates of oxygen consumption, mitochondrial transmembrane potential ($\Delta\Psi$) and mitochondrial susceptibility to permeability transition pore opening were evaluated in the presence and absence of salicylate.

In both adult and aged groups, salicylate induced an increase in the rate of oxygen consumption in state 2 state with consequent compromise of respiratory control ratio. Salicylate also affected maximal $\Delta\Psi_m$ and the fluctuations associated with phosphorylation cycle (depolarization and repolarization). In the absence of salicylate, the lag phase for ADP phosphorylation of the aged group increased when compared to adult group and decreased in the presence of salicylate. There were observed no significant alterations in the swelling amplitude, despite a slight increase in the aged group in the presence of salicylate.

The results demonstrate that salicylate has a harmful effect on liver mitochondrial function leading to the uncoupling of oxidative phosphorylation; however, contrarily to the expected, liver mitochondria from aged group seems to be more efficient in the ADP phosphorylation (as seen by lag phase) than adult group in the presence of salicylate.

KEY WORDS: MITOCHONDRIAL BIOENERGETICS, SALICYLATE, AGING, LIVER TOXICITY

1. Introdução

Sendo um processo multifatorial complexo, o envelhecimento caracteriza-se pelo declínio geral da função fisiológica que leva à morbidade e mortalidade.

O fígado, com as suas múltiplas funções na fisiologia humana, é referido como um órgão particularmente suscetível às alterações derivadas do envelhecimento, justificando-se deste modo a elevada incidência de patologias hepáticas com consequente comprometimento funcional em pessoas idosas (Molpeceres et al., 2007).

A disfunção mitocondrial está associada ao processo normal do envelhecimento em diversos tecidos, assim como à etiologia de diversas doenças degenerativas no idoso (Mather & Rottenberg, 2000; Reddy, 2008). Desta forma a mitocôndria está intimamente envolvida no processo de envelhecimento porque este organelo é considerado uma das principais vias intracelulares de formação de espécies reativas de oxigénio (EROS). As EROS são resultantes do metabolismo oxidativo e são geradas continuamente. O envelhecimento aparece associado ao enfraquecimento do sistema antioxidante conduzindo a uma alteração do estado redox levando ao aumento do stress oxidativo (SO) (Lee, Sung, Kim, & Park, 2009; Paradies, Petrosillo, Paradies, & Ruggiero, 2010). A alteração do estado redox é, igualmente, um dos mecanismos que desencadeia a inflamação crónica no envelhecimento (Chung et al., 2009; Paradies et al., 2010). A lesão e disfunção mitocondriais representam mecanismos intra-celulares bastante associados à fisiopatologia da lesão hepática induzida por inúmeras condições (Begrache, Massart, Robin, Borgne-Sanchez, & Fromenty, 2011; Pessayre, Mansouri, Berson, & Fromenty, 2010).

Das condições descritas como indutoras de disfunção hepática encontram-se as dietas hipercalóricas e consequente obesidade, dietas ricas em colina e em frutose, assim como a ação de algumas drogas largamente utilizadas no tratamento de inúmeras patologias. Efetivamente, o fígado desempenha um papel importante na detoxificação de muitos fármacos sendo que o envelhecimento produz uma redução na sua função, diminuindo, por sua vez, a

capacidade de regeneração dos hepatócitos (Castillo et al., 2005). Dado o seu importante papel no metabolismo celular, as mitocôndrias têm sido consideradas sensores de toxicidade e função de muitos tecidos e órgãos, incluindo o fígado. Assim sendo, vários mecanismos conducentes à disfunção mitocondrial nos hepatócitos têm sido descritos, incluindo a suscetibilidade à indução do poro de permeabilidade transitória (PPT) e, conseqüentemente, ao esgotamento das reservas de adenosina trifosfato (ATP) levando à necrose hepática ou à apoptose através da libertação de proteínas apoptóticas, alterações deletérias na bioenergética mitocondrial hepática, e incremento do stress e lesão oxidativas em consequência da elevada geração de EROS (Pessayre et al., 2010).

Diversas drogas, bem como os metabolitos a estas associados, têm sido relacionados com a disfunção mitocondrial nos hepatócitos, podendo conduzir à esteatose hepática. Normalmente, as drogas que induzem esteatose hepática são compostos que debilitam a cadeia respiratória mitocondrial (CRM) provocando não só perturbações na oxidação dos ácidos gordos, mas também reforçam a produção de EROS, parecendo ser esta a chave da patogénese da esteatose hepática induzida por drogas (Labbe, Pessayre, & Fromenty, 2008; Pessayre et al., 2010). Os salicilatos e as drogas não esteróides, como o salicilato de sódio e a aspirina, são amplamente prescritos para tratar a inflamação com particular incidência na população idosa. Estes têm efeitos prejudiciais sobre as mitocôndrias isoladas causando o desacoplamento da fosforilação oxidativa e tumefação (Battaglia, Salvi, & Toninello, 2005), podendo estar na origem das lesões hepáticas (Labbe et al., 2008).

Assim, este estudo teve como objetivo analisar o efeito do envelhecimento na resposta mitocondrial hepática *in vitro* à disfunção induzida pela presença de salicilato, um tópico ainda por descrever na literatura.

2. Revisão da Literatura

2.1 Características clássicas da bioenergética mitocondrial

2.1.1 A mitocôndria

As mitocôndrias são organelos celulares que surgiram há cerca de 1,5 bilhões de anos, com origem endossimbiótica mantendo, ainda hoje, algumas das características dessa origem como a estrutura membranar dupla e o genoma mitocondrial circular com transcrição, translação e sistema síntese de proteínas específicos (Wallace, 1999). Tendo adquirido a designação “mitocôndria”, por Benda no séc. XIX, que significa “grânulo fusiforme”, sabe-se agora que as mitocôndrias têm aspetos morfológicos e tamanhos variáveis. Altman, na mesma altura, considerou que as mitocôndrias eram unidades básicas de atividade celular semelhantes às bactérias (Azevedo, 2005).

Sendo o centro do metabolismo celular, as mitocôndrias constituem-se como os principais produtores energéticos (Ballard & Whitlock, 2004; Wallace, 1999). Uma vez que 90% do ATP utilizado nas células para reações metabólicas (Gunter, Yule, Gunter, Eliseev, & Salter, 2004) provém diretamente das reações que o correm a nível mitocondrial. O número de mitocôndrias varia de órgão e entre tecidos desde algumas centenas até milhares de mitocôndrias (Wallace, 1999). Lenhinger e Kennedy (1959) referiram que as mitocôndrias contêm proteínas envolvidas na oxidação dos nutrientes e na respiração celular. Atualmente, considera-se que as mitocôndrias não são apenas produtoras de energia mas têm funções vitais na célula como o controlo do estado redox e pH, a homeostasia do ião cálcio (Ca^{2+}), β -oxidação, ciclo da ureia, síntese e metabolismo das proteínas que contêm ferro, sinalização e morte celular (apoptose e necrose) (Ascensao, Lumini-Oliveira, Oliveira, & Magalhaes, 2011; Pessayre et al., 2010; Scherz-Shouval & Elazar, 2011; Skulachev, 2000).

O comprometimento da funcionalidade mitocondrial está associado quer a inúmeras patologias (Duchen, 2004) principalmente quando afeta órgãos com

elevadas necessidades energéticas (Azevedo, 2005), quer ao processo de envelhecimento (Wallace, 1999). Além disso, as alterações no DNA mitocondrial encontram-se na base das doenças mitocondriais (Dickens, 2008).

2.1.2 A produção de energia pela mitocôndria

Entre as muitas funções da mitocôndria, a principal é sem dúvida a produção de energia sob a forma de ATP (Gunter & Sheu, 2009). A produção de ATP ocorre através de diferentes vias metabólicas:

- (i) Glicólise, no citosol;
 - (ii) Ciclo de Krebs, através de enzimas presentes na matriz mitocondrial;
 - (iii) Cadeia Transportadora de Eletrões (CTE), composta por cinco complexos enzimáticos, pela ubiquinona (coenzima Q) e pelo citocromo C, localizada na membrana interna da mitocôndria (Azevedo, 2005).
- A principal fonte de energia celular é a glicose. Inicialmente, a glicose é degradada no citosol da célula na glicólise, durante a qual se formam duas moléculas de ATP e piruvato que será oxidado num complexo denominado piruvato desidrogenase formando NADH e acetil-CoA que será seguidamente oxidada no Ciclo de Krebs. A oxidação completa deste substrato formará GTP, CO₂, e equivalentes reduzidos (3 NADH e 1 FADH₂). Estes substratos são posteriormente reduzidos e os eletrões provenientes são doados ao oxigénio (O₂) através da cadeia transportadora de electrões (Ascensao et al., 2011). O fluxo de eletrões através dos complexos I, III e IV da CRm está associado ao bombeamento de protões (H⁺) da matriz para o espaço intramembranar formando um gradiente de protões e originando um potencial eletroquímico de membrana ($\Delta\Psi_m$). A dissipação deste gradiente, através do retorno dos protões a partir do complexo V (ATP sintetase) permite a síntese do ATP (Azevedo, 2005) (Ascensao et al., 2011; Brookes, Yoon, Robotham, Anders, & Sheu, 2004; Pessayre et al., 2010; Wallace, 1999). Um dos elementos preponderantes para o apropriado funcionamento dos mecanismos mitocondriais de produção de energia é constituição da membrana interna

mitocondrial. Para tal contribui composição da qual fazem parte fosfolípidos, nomeadamente a cardiolipina, bem como de inúmeras proteínas transportadoras de que são exemplo o translocador de nucleótidos de adenina (ANT), o transportador de di e tri-carboxílicos, as proteínas desacopladoras (UCPs) entre outras que permitem um normal funcionamento e interação com os processos extra mitocondriais. A título de exemplo, o ANT permite a troca do ATP/ ADP entre a matriz e o espaço extra mitocondrial ($\text{ATP}_{\text{out}}\text{--ATP}_{\text{in}}$) (Mannella, 2006).

2.1.3. O Equilíbrio redox e a produção de radicais e de espécies reativas

Os radicais livres são átomos ou moléculas com eletrões desemparelhados nas suas orbitais externas sendo altamente reativo se instáveis. Os radicais existentes nos sistemas biológicos encontram-se associados a 4 átomos: carbono (C), enxofre (S), azoto (N) e oxigénio (O). Para além destes radicais, existem compostos celulares que, apesar de não terem nenhum eletrão desemparelhado na sua estrutura química, são altamente reativas e potencialmente, também elas, fontes de radicais livres. No seu conjunto, estes compostos são genericamente denominados espécies reativas (Ascensao, Magalhaes, Soares, Oliveira, & Duarte, 2003).

As espécies reativas que reagem com o O_2 denominam-se EROS, e as espécies reativas que têm origem numa reação entre o O_2 e/ou o nitrogénio (N) denominam-se espécies reativas de oxigénio e nitrogénio (ERONS), uma subclasse das EROS (Penna, Mancardi, Rastaldo, & Pagliaro, 2009).

Embora alguns autores tenham recentemente sugerido outras fontes celulares importantes na produção de ERONS (Brown & Borutaite, 2011), a mitocôndria é classicamente considerada a principal fonte de ERONS (Feissner, Skalska, Gaum, & Sheu, 2009). O local da formação das ERONS não está bem esclarecido mas pensa-se que se situa nos complexos I e III da CTE (Feissner et al., 2009; Starkov et al., 2004). Alguns eletrões do complexo I e III escapam ligando-se ao O_2 e formam o ião superóxido ($\text{O}_2^{\cdot-}$). O $\text{O}_2^{\cdot-}$ não é muito reativo e,

normalmente, é dismutado pela superóxido dismutase (SOD) originando peróxido de hidrogénio (H_2O_2) que é convertido em água (H_2O) pela glutathionaperoxidase (GPx). Mas, o H_2O_2 na presença de metais reduzidos, como o ferro, pode ser convertido num radical altamente reativo, o radical hidroxilo (OH^\bullet) que por sua vez poderá desencadear a peroxidação lipídica libertando produtos lipídicos reativos. Por vezes, o $O_2^{\bullet-}$ reage com o óxido nítrico formando o peroxinitrito ($ONOO^-$) que é também altamente reativo (Pessayre et al., 2010; Wallace, 1999).

A produção de ERONS é um processo contínuo mesmo durante o metabolismo normal da célula. Em condições fisiológicas normais, a mitocôndria tem mecanismos próprios de eliminar essas espécies prevenindo danos celulares, ou até, morte celular (Muthukumar & Selvam, 1998). O estado oxidação-redução das células é uma consequência do equilíbrio entre o nível de ERONS, oxidantes e de compostos antioxidantes. Os principais antioxidantes da mitocôndria incluem segundo Okado-Matsumoto & Fridovich, (2001):

- (i) SOD nas suas duas formas (MnSOD e CuSOD);
- (ii) GPx/ glutathionaredutase (GSH), coenzima Q_{10} (ubiquinona);
- (iii) creatina;
- (iv) nicotinamida;
- (v) glutathiona reduzida
- (vi) vitamina E
- (vii) catalase

O desequilíbrio entre níveis de ERONS e antioxidantes induz uma condição de SO adicional (Feissner et al., 2009). Radicais altamente reativos podem danificar o DNA, proteínas e complexos lipídicos provocando danos celulares e, eventualmente, morte celular (Gunter et al., 2004; Khand, Gordge, Robertson, Noronha-Dutra, & Hothersall, 2002; Pessayre et al., 2010).

Quando o nível de ERONS é moderadamente elevado, estas atuam como moléculas sinalizadoras de vários processos intracelulares tais como o da atividade da ATPase, vias metabólicas do transporte da glicose, Ca^{2+} , atividade creatina quinase, biogénese mitocondrial e síntese de antioxidantes (Ji, 2007).

2.1.4. Controle da homeostasia do cálcio

A mitocôndria e o retículo endoplasmático (RE) têm um papel essencial na regulação da concentração do Ca^{2+} intracelular.

Quando Ca^{2+} é libertado do RE para o citoplasma a mitocôndria capta parte desse Ca^{2+} para prevenir a propagação de ondas de Ca^{2+} . Adicionalmente, quando há excesso de Ca^{2+} no citosol, a mitocôndria capta-o para restabelecer a homeostasia citosólica (Ascensao et al., 2011; Smaili et al., 2003). Uma vez que a mitocôndria tem um limite para a captação e acumulação deste íon, quando os níveis captados ultrapassam o limiar de acumulação, ocorrem distúrbios moleculares e estruturais nas mitocôndrias, levando à subsequente libertação deste e de outros solutos para o citosol.

A mitocôndria regula os níveis de Ca^{2+} utilizando a energia eletroquímica ($\Delta\Psi_{m=}$) do mesmo como força motriz ao longo da membrana interna (Feissner et al., 2009) através de mecanismos de transporte que o permitem captá-lo e libertá-lo (Smaili et al., 2003).

Apesar de relativamente impermeável, a membrana interna está dotada de vários canais de transporte dos quais a via uniporter é considerada a principal via de captação de Ca^{2+} da mitocôndria. É um canal iónico altamente seletivo que lhe permite captar grandes quantidades de Ca^{2+} do citosol (Ascensao et al., 2011; Feissner et al., 2009). Um segundo mecanismo de captação é o “modo rápido” que permite a rápida captação no início do impulso de Ca^{2+} citosólico. Este mecanismo permite à mitocôndria a ativação imediata dos processos fisiológicos dependentes do Ca^{2+} , sem um eventual atraso da captação mais lenta pela via uniporter. Um terceiro mecanismo de captação foi identificado como sendo o recetor de rianodina (RyR), localizado na membrana interna das mitocôndrias (Brookes et al., 2004; Feissner et al., 2009; Gunter & Sheu, 2009).

Para além dos mecanismos de captação, a mitocôndria dispõe de dois mecanismos de libertação do Ca^{2+} : o dependente do sódio (Na^+) e o permutador independente do Na^+ . O PTP é também sugerido como sendo um

mecanismo de libertação de Ca^{2+} para o citoplasma através da abertura transitória (Feissner et al., 2009).

O Ca^{2+} é um importante modelador positivo da função mitocondrial e interage em diversos níveis no interior do organelo nomeadamente na estimulação da fosforilação oxidativa (Brookes et al., 2004). Vários estudos demonstram que a captação de Ca^{2+} aumenta a produção de NADH ativando a ATPsintetase e o ANT promovendo a síntese do ATP (Ascensao et al., 2011). O facto de a mitocôndria utilizar o Ca^{2+} intramitocondrial para controlar a taxa de produção de ATP implica que o Ca^{2+} também regula a produção de EROS, uma vez que estas também são produzidas durante a respiração (Gunter & Sheu, 2009).

A primeira consequência do aumento de Ca^{2+} é a atividade acelerada da CRm na fosforilação oxidativa que leva a uma maior produção de ATP (Brookes et al., 2004).

Na presença de elevadas concentrações de Ca^{2+} na matriz, principalmente quando associada ao aumento da produção de ERONS, fosfato alto, baixa concentração de nucleótidos de adenina e/ou diminuição de pH, verifica-se a abertura do PTP, o que permite a difusão de moléculas $<1,5\text{KDa}$, levando à perda da homeostasia iónica e ao desacoplamento da fosforilação oxidativa causando danos irreversíveis na mitocôndria, resultando na estimulação da morte celular (Halestrap, 2006; Paradies et al., 2010). Então, os efeitos do Ca^{2+} na função mitocondrial são antagónicos, isto é, por um lado é um estimulador da fosforilação oxidativa e, por outro lado, o excesso de Ca^{2+} leva à abertura do PTP e, conseqüentemente, à indução da apoptose (Feissner et al., 2009).

2.1.5. Morte celular por apoptose

A apoptose é um mecanismo fisiológico de morte celular programada (Tsujimoto, Nakagawa, & Shimizu, 2006), associada a um conjunto de alterações morfológicas e bioquímicas na célula (Lawen, 2003). É um processo fisiológico essencial para o desenvolvimento e manutenção dos tecidos celulares (Desagher & Martinou, 2000), permitindo ao organismo controlar

rigorosamente o número de células e tamanho do tecido para se proteger de agentes que possam ameaçar a homeostasia celular (Hengartner, 2000). No entanto, para além do controlo de diversos processos vitais, a apoptose está associada a inúmeras doenças. Durante a apoptose, a célula sofre alterações morfológicas que incluem a retração da célula, perda de aderência com a matriz extracelular e células vizinhas, condensação da cromatina, fragmentação internucleossómica do DNA e formação de corpos apoptóticos (Lawen, 2003). A apoptose ocorre através de duas vias de sinalização: intrínseca e extrínseca.

A via extrínseca envolve a ativação de recetores de morte através da ligação extracelular de ligantes específicos a um grupo de recetores de membrana como o Fas e o recetor fator de necrose tumoral (TNF- α) (Lawen, 2003).

A via intrínseca inclui a mitocôndria, os lisossomas e o retículo endoplasmático (Servais et al., 2008). A via intrínseca mitocondrial encontra-se associada à perda do $\Delta\Psi_m$ motivada a abertura do PTP, que leva à libertação de várias proteínas do espaço intramembranar para o citoplasma incluindo moléculas pro-apoptóticas como o citocromo c, Smac/Diablo, HtrA2 (Omi), AIF e DNaseG (Tsujimoto et al., 2006). Após a libertação do citocromo do espaço intramembranar da mitocôndria para o citosol e na presença de ATP, este liga-se ao Apaf1 desencadeando a formação da apoptossoma (Desagher & Martinou, 2000; Servais et al., 2008). Há muitas moléculas envolvidas na formação e aquisição de estrutura favorável à abertura do poro que incluem a Bax, ANT, VDAC e a ciclofilina D (Lawen, 2003). A indução da abertura do PTP pode ocorrer através de diferentes estímulos como a produção de EROS ou o aumento de cálcio celular (Pessayre et al., 2010), e ser influenciada parcialmente por um conjunto de moléculas da família Bcl2. A principal função destas proteínas, prevenindo a abertura do PTP, é regular a libertação dos fatores apoptóticos, particularmente do citocromo c, do espaço intramembranar para o citosol (Desagher & Martinou, 2000; Hengartner, 2000). Elas dividem-se em anti-apoptóticas (Bcl2, Bclx) e pró-apoptóticas (Bad, Bid, Bim) (Desagher & Martinou, 2000; Servais et al., 2008). Para além das Bcl2, as proteínas de choque térmico HSP70 têm sido apontadas como moléculas anti-apoptóticas

importantes, estando localizadas no citosol e na mitocôndria (Beere et al., 2000). Os níveis relativos de proteínas pró-apoptóticas e anti-apoptóticas determinam a suscetibilidade das células para a apoptose (Lawen, 2003).

As duas vias de sinalização apoptótica, intrínseca e extrínseca, convergem num nível de proteases de cisteína específicas - as caspases (Servais et al., 2008). Funcionalmente, as caspases dividem-se em iniciadoras (caspases 2, 8, 9 e 10) e efetoras (3, 6 e 7). As caspases iniciadoras ligam-se às efetoras e estas ligam-se aos substratos celulares e desencadeiam todas as reações morfológicas da apoptose (Lawen, 2003).

2.2 O papel da mitocôndria na função hepática e na doença

2.2.1 A mitocôndria na funcionalidade hepática

O fígado é um órgão com um conjunto diversificado de funções bioquímicas necessárias à homeostasia de todo o organismo. Em condições basais, 1,5l de sangue são transportados para o fígado por minuto, fornecendo um elevado conjunto de compostos requeridos nos processos metabólicos (Fabbrini, Sullivan, & Klein, 2010). As células mais predominantes deste órgão denominam-se hepatócitos e possuem funções endócrinas e exócrinas e contribuem para a desintoxicação de diversos produtos xenobióticos. São, ainda, responsáveis pela produção da bília e pela glicogénese (Gores, Malhi, & Guicciardi, 2010). Ocupando cerca de 20% do citoplasma dos hepatócitos, desempenham um papel importante no extenso mecanismo oxidativo e nas diversas funções do fígado mantendo a integridade dos hepatócitos (Grattagliano et al., 2011; Hassanein & Frederick, 2004). Como organelos respiratórios conservam a energia da oxidação dos substratos sob a forma de fosfatos de alta energia, energia esta necessária para as funções metabólicas e integridade celular (Hassanein & Frederick, 2004). A mitocôndria tem um papel fundamental no metabolismo energético dos vários tecidos incluindo o fígado. A disfunção dos complexos desta cadeia tem um papel importante nas

patogêneses de algumas doenças crônicas e na ocorrência de distúrbios metabólicos (Johannsen & Ravussin, 2009). Também, a disfunção da CTE leva à diminuição do mecanismo oxidativo de vários substratos, à diminuição da síntese do ATP e a tolerância dos hepatócitos perante o SO fica diminuída. O comprometimento funcional das mitocôndrias é muitas vezes acompanhado por mudanças estruturais que resultam na tumefação do organelo e na formação de inclusões da matriz mitocondrial (Grattagliano et al., 2011). A disfunção mitocondrial não só prejudica a homeostasia da gordura no fígado, mas também leva a uma superprodução de EROS desencadeando a peroxidação lipídica, superprodução de citocinas e morte celular (Begrache, Igoudjil, Pessayre, & Fromenty, 2006). De referir que, os hepatócitos são protegidos das células da morte apenas por duas proteínas anti-apoptóticas: Bcl-_xl e Mcl-1, que não têm funções redundantes (Gores et al., 2010). Assim, as mitocôndrias estão envolvidas no metabolismo da gordura e produção de energia dos hepatócitos, isto é, na oxidação dos ácidos gordos (β -oxidação) e na fosforilação oxidativa (Oliveira et al., 2006; Pessayre & Fromenty, 2005). Os ácidos gordos são sintetizados no fígado a partir do plasma quer pela β -oxidação mitocondrial, quer para serem estratificados em triglicerídeos que se podem acumular como gotículas de gordura citoplasmática ou serem secretadas como lipoproteínas de baixa densidade (VLDL) (Pessayre & Fromenty, 2005; Pessayre, Mansouri, & Fromenty, 2002). A entrada da longa cadeia de ácidos gordos dentro da mitocôndria está dependente da carnitinapalmitoiltransferase I, uma enzima situada na membrana externa da mitocôndria cuja atividade é inibida pela malonil-CoA. Esta é formada pela acetil-CoAcarboxilase sendo este o 1º passo da síntese dos ácidos gordos a partir da acetil-CoA. Uma vez dentro da mitocôndria, os ácidos gordos livres (AGL) são divididos pelos ciclos da β -oxidação mitocondrial em subunidades de acetil-CoA que serão posteriormente oxidadas no ciclo de Krebs (Fromenty, Robin, Igoudjil, Mansouri, & Pessayre, 2004; Pessayre & Fromenty, 2005). O NADH e FADH₂ formados transferem os seus eletrões para a CRm. Alguns destes eletrões reagem diretamente com o oxigénio formando o radical O₂[•] e outras EROS. O radical O₂[•] é posteriormente dismutado pelo MnSOD em H₂O₂

que depois é reduzido a água pela GPX mitocondrial. Esta enzima tem um papel importante nesta última etapa pois as mitocôndrias do fígado não têm catalase. De salientar que, GPX necessita de um aporte adequado de GSH dentro da matriz mitocondrial para poder reduzir o H_2O_2 . Então, o esgotamento da GSH mitocondrial, abaixo do nível crítico, pode levar, ou favorece, a disfunção mitocondrial e morte celular (Begrache et al., 2006). Mais ainda, a acumulação de elétrons na CRm aumenta o potencial de elétrons que se podem ligar a radicais livres de oxigênio podendo contribuir para um conjunto diversificado de condições patológicas incluindo doenças degenerativas, cancro e envelhecimento (Johannsen & Ravussin, 2009).

2.2.2. As doenças hepáticas

Um conjunto de evidências sugere que a apoptose mediada pela mitocôndria é a chave do mecanismo de lesão nas doenças hepáticas. O SO leva à disfunção mitocondrial conduzindo à abertura do poro PTP dando início ao processo de morte celular. Além disso, o aumento do SO desregula o processo de transcrição do FAS ligante no interior dos hepatócitos podendo este ligar-se aos recetores de morte (FAS) em membranas vizinhas dos hepatócitos induzindo a apoptose (Hassanein & Frederick, 2004; Pessayre et al., 2002). A disfunção mitocondrial ocorre quando o hepatócito é exposto a um stress fisiológico excessivo.

Assim, a maioria das doenças parece envolver a mitocôndria como alvo primário ou secundário. Subsequente depleção ou disfunção mitocondrial pode explicar alguns dos mecanismos fisiológicos da lesão e disfunção dos hepatócitos e de quase todas as doenças hepáticas (Hassanein & Frederick, 2004). Então, a disfunção mitocondrial está implicada na maioria das doenças do fígado, podendo ser hereditária ao que conduz a hepatopatias neonatais ou infantis acompanhadas normalmente da disfunção de outros órgãos. Estas hepatopatias mitocondriais primárias são um subconjunto das doenças mitocondriais da CRm; ou adquirida, levando a hepatopatias mitocondriais

secundárias que incluem a esteatose hepática, doença do fígado induzida por drogas, doença do fígado não alcoólica, entre outras. Apesar das variadas doenças envolver vários insultos no parênquima dos hepatócitos, a disfunção mitocondrial ocorre quando o hepatócito é exposto a um stress fisiológico excessivo (Hassanein & Frederick, 2004).

2.2.3. NASH

A manifestação da doença hepática está associada a diversas causas, nomeadamente ao consumo excessivo de álcool que pode, entre outra coisas, levar a esteatose hepática (hepatite alcoólica). No entanto, outros fatores ambientais que não o álcool, a hereditariedade ou ambos, são também apontados como possíveis agentes no desenvolvimento da doença hepática. Dietas ricas em calorias e lípidos e a falta de exercício físico estão a conduzir à obesidade, resistência à insulina e aumento de lípidos no fígado podendo desencadear a esteatose hepática não alcoólica (NASH). Esta também pode ser induzida por drogas, produtos xenobióticos e certas infeções como as associadas ao vírus da hepatite B e C e, ainda, a doenças intestinais (doença de Crohn) (Begrache et al., 2006; Rivera, 2008).

Há um conjunto de evidências consistentes que apontam que a disfunção mitocondrial (mais especificamente ao nível da CTE) desempenha um papel fundamental na fisiopatologia da esteatose e da NASH, independentemente das suas causas iniciais (Begrache et al., 2006; Fromenty et al., 2004; Sastre et al., 2007). A esteatose hepática caracteriza-se pelo acúmulo de gotículas de gordura no plasma dos hepatócitos. Esta permanece isolada, isto é, sem outras lesões hepáticas em alguns pacientes mas, noutros desencadeia uma apoptose ligeira e necrose das células do fígado, uma inflamação celular e um lento desenvolvimento de fibrose hepática que poderá evoluir progressivamente para cirrose após vários anos ou décadas e podendo acabar por degenerar num carcinoma hepatocelular (Begrache et al., 2006). A associação da esteatose com estas lesões hepáticas denomina-se NASH e

ocorre quando o consumo de álcool é nulo ou insignificante (Fromenty et al., 2004). Estudos recentes têm demonstrado que pacientes de NASH apresentam alterações ultraestruturais mitocondriais, diminuição da síntese do ATP hepático e aumento da produção de EROS (Hassanein & Frederick, 2004; Sastre et al., 2007). Desta forma, a NASH poderá ser considerada, até certo ponto, como uma doença mitocondrial uma vez que a disfunção mitocondrial está envolvida em sucessivos níveis da sua patogénese, prejudicando a homeostasia do fígado induzindo uma superprodução de EROS que por sua vez desencadeia a peroxidação lipídica, a libertação de citocinas e morte celular (Pessayre & Fromenty, 2005; Sastre et al., 2007). Existem diversos mecanismos explicativos para a NASH. Durante a NASH, os hepatócitos estão lotados de ácidos gordos livres (AGL) mas, o fígado não alarga indefinidamente; os hepatócitos atingem um novo estado de equilíbrio energético. Isto é conseguido através de diferentes mecanismo sendo um deles a absorção e síntese nos hepatócitos dos AGL através da β -oxidação mitocondrial e do aumento da cetogénese (produção de corpos cetónicos a partir da β -oxidação) (Fromenty et al., 2004; Sastre et al., 2007). Outro mecanismo poderá ser o aumento da atividade CPT1 (carnitinapalmitoil transferase 1), aumentando desta forma o transporte da longa cadeia de ácidos gordos para a β -oxidação (Sastre et al., 2007).

Mesmo em estado basal, os hepatócitos produzem EROS em diferentes locais incluindo na cadeia transportadora de eletrões (CTE) e no citocromo microssomal e mitocondrial P-450 2E1. Esta produção de EROS mitocondrial é ainda maior em fígados gordos (Pessayre & Fromenty, 2005) ricos em lípidos. A grande produção de ERONS oxida os lípidos insaturados dos depósitos de gordura causando a peroxidação lipídica. Os produtos desta atacam diretamente e inativam os complexos da CRm incluindo a citocromo C oxidase, a oxidase terminal da CRm (Begrache et al., 2006; Pessayre & Fromenty, 2005). Nos hepatócitos, ERONS e produtos da peroxidação lipídica prejudicam ainda mais a CRm através do dano oxidativo no genoma mitocondrial (Begrache et al., 2006).

De facto, vários estudos apontam o dano na CTE como sendo a fonte de EROS mitocondrial em NASH e estudos mais recentes sugerem que a expressão ectópica do citocromo P450 na mitocôndria pode desempenhar um papel importante na superprodução de ERO não só nos hepatócitos mas também dentro da mitocôndria, para além da sua localização dentro do retículo endoplasmático (Begriche et al., 2006). Mais ainda, esta superprodução de ERO promove a expressão de diversas citocinas incluindo a FASligand e a TNF- α (Serviddio et al., 2008). TNF- α atua nos recetores dos hepatócitos desencadeando a permeabilidade das membranas mitocondriais, libertando o citocromo c do espaço intramembranar mitocondrial para o citosol, bloqueando parcialmente o fluxo de eletrões do complexo III para o complexo IV (Pessayre & Fromenty, 2005). De facto, a NASH é uma desordem metabólica e parece estar associada a um estilo de vida aliado a uma dieta rica e à falta de exercício físico. Desta forma, a alimentação e o exercício físico são fatores importantes e determinantes quer na prevenção da esteatose hepática, quer na progressão da fibrose hepática, pois o consumo excessivo de alimentos e a falta de exercício físico contribuem para o aumento do peso (Moore, 2010).

2.2.3.1 Obesidade

O peso excessivo tornou-se a nova epidemia deste século e o 6º fator de risco mais importante no mundo, tendo a obesidade aumentado nos últimos 25 anos, sendo já um problema de saúde pública, estando este aumento relacionado com a grande prevalência de depósitos de gordura no fígado (Balistreri, Caruso, & Candore, 2010; Speliotes, 2009). Caracteriza-se pelo desequilíbrio entre o consumo e o gasto energético em favor do primeiro (Rogge, 2009).

Evidências crescentes indicam que disfunções mitocondriais na produção de energia a partir de substratos alimentares pode ser a via mais comum para o desenvolvimento e perpetuação da obesidade. Além disso, a disfunção mitocondrial ajuda a explicar um certo número de sinais e sintomas comuns da obesidade incluindo o baixo gasto energético, marcadores de inflamação

sistêmica e ingestão crônica de alimentos (Rogge, 2009). As mitocôndrias têm um papel fundamental nas fontes transportadoras de combustível quer para a produção, quer para o armazenamento de ATP. Quando a ingestão de alimentos é superior às necessidades energéticas, o ciclo de Krebs e a oxidação lipídica diminuem, levando ao aumento da síntese dos ácidos gordos. Menos citrato entra na mitocôndria para abastecer o ciclo de Krebs e, em vez disso, é convertido em gordura acetil-CoA (Rogge, 2009).

Assim, o metabolismo energético celular é prejudicado na obesidade e muitos dos distúrbios identificados na produção e conversão de energia convergem na mitocôndria. As principais anomalias metabólicas identificadas na obesidade são: diminuição da oxidação lipídica e maior dependência de glicose para a síntese do ATP; acumulação ectópica de lípidos nos tecidos do músculo esquelético, fígado e de outros tecidos; e baixa concentração basal de ATP (Pessayre et al., 2002). Para além de alterações ultraestruturais das mitocôndrias, os indivíduos obesos parecem apresentar diferenças distintas nos marcadores enzimáticos do metabolismo energético em relação aos não obesos (Pessayre et al., 2002). Entre as anomalias na produção de energia mitocondrial encontradas na obesidade, a alteração do metabolismo da gordura é particularmente acentuada, ou seja, a oxidação dos ácidos gordos é reduzida (Rogge, 2009). Devido à infiltração hepática de gordura, é comum observar-se nos obesos esteatose hepática que poderá progredir para NASH, fibrose ou cirrose (Rogge, 2009). Então, os principais distúrbios metabólicos associados à obesidade são dislipidemia, aumento da pressão arterial, resistência à insulina e intolerância à glicose, e estado pró-trombótico (Grundy, 2000). Estes distúrbios, por sua vez, contribuem para o desenvolvimento de doenças cardiovasculares, diabetes tipo 2, esteatose hepática e NASH e ainda, a obesidade pode provocar distúrbios no metabolismo celular que aumentam o risco de diversos cancros (Grundy, 2000; Portincasa, Grattagliano, Palmieri, & Palasciano, 2006).

2.2.3.2 Frutose

Para além e a par da obesidade, o consumo de frutose na dieta ocidental também tem sido associado à prevalência das doenças hepáticas (Moore, 2010). A doença hepática não alcoólica é caracterizada por duas etapas de lesão hepática: o acúmulo de lípidos intra-hepáticos (esteatose hepática) e a progressão inflamatória intra-hepática (NASH) (Fromenty et al., 2004; Moore, 2010). O fígado é o principal local do metabolismo frutose, possuindo o transportador de frutose específico Glut-5 (Lim, Mietus-Snyder, Valente, Schwarz, & Lustig, 2010). Após a absorção da frutose, ela é extraída rapidamente, quase na sua totalidade, pelo fígado sendo rapidamente metabolizada em frutose e fósforo pela ação da enzima frutoquinase. O metabolismo hepático da frutose promove a lipogénese de lípidos intra-hepáticos, a inibição da β -oxidação mitocondrial de ácidos gordos de longa cadeia, a formação de triglicerídeos, esteatose hepática e resistência à insulina no músculo-esquelético e hiperglicemia. Devido à sua instabilidade molecular, a frutose promove a reação com proteínas e a formação de ERO que requerem a extinção através de antioxidantes hepáticos (Lim et al., 2010). Estudos demonstram que grandes quantidades de frutose, em combinação com a insuficiência de micronutrientes podem prejudicar a glutathione e provavelmente outras reservas hepáticas de antioxidantes contribuindo também para o dano hepático, e para a evolução da esteatose para NASH. A frutose é altamente lipogénica pois fornece grandes quantidades de triose-fosfatoisomerase hepática como precursora para a síntese dos ácidos gordos e também tem um papel na expressão de enzimas lipogénicas no fígado nomeadamente o fator de transcrição SREBP-1c, um dos principais indutores da lipogénese hepática (Lim et al., 2010).

Como o consumo elevado de frutose associa-se a comportamentos de risco adicionais como a dieta hipercalórica, dieta rica em gordura saturada e a falta de exercício físico, sendo por isso difícil determinar quantitativamente os efeitos prejudiciais provenientes do consumo da mesma (Tappy & Le, 2010).

2.2.3.3 Dieta rica em Colina

A colina é um nutriente essencial com funções na integridade da membrana celular, na sinalização transmembranar, síntese da fosfatidilcolina, neurotransmissão e no metabolismo do grupo metil (Ariz, Mato, Lu, & Martinez Chantar, 2010; Guo et al., 2005; Zeisel & da Costa, 2009). Devido ao seu importante papel no metabolismo da estrutura da colina para a síntese de neurotransmissores, o déficit de colina foi reconhecido como tendo responsabilidade em doenças como a NAFLD, a aterosclerose e, possivelmente, distúrbios neurológicos (Zeisel & da Costa, 2009). A deficiência de colina produz alterações patológicas em vários órgãos sendo o fígado o principal alvo causando esteatose, morte celular, cirrose e cancro (Guo et al., 2005; Repetto, Ossani, Monserrat, & Boveris, 2010). Este déficit provoca dano oxidativo no fígado através da peroxidação lipídica dos organelos subcelulares e uma diminuição dos antioxidantes (Repetto et al., 2010). A colina e a metionina são no seu conjunto essenciais para a β -oxidação hepática e para a produção de VLDL. O seu déficit leva à acumulação de lípidos intra-hepáticos e à diminuição da síntese de VLDL (Hebbard & George, 2011). Os mecanismos relatados da indução de NASH pela dieta deficiente em colina e metionina incluem a interrupção da fosfatidilcolina (lipoproteína da membrana celular) causando uma deficiência de colina e metionina, aumento do potencial de stress oxidativo, aumento do potencial de fibrogénese, aumento da produção de moléculas próinflamatórias e prófibróticas e a ativação do NF- κ B como um elo importante entre stress oxidativo, inflamação crónica e fibrogénese hepática (Fan & Qiao, 2009). Também, o prejuízo da β -oxidação leva à expressão do citocromo p-450 2E1, um evento característico dos pacientes com NASH. Isto promove o stress oxidativo e associa-se à esteatose-hepatite, juntamente com níveis elevados de TNF- α plasmático. Então, o déficit de colina e metionina induz a produção de EROS, causa danos no DNA mitocondrial e morte celular por apoptose (Ariz et al., 2010). Mais ainda, a deficiência de colina é o único estado nutricional que causa cancro hepático por si só, isto é, sem estar associado outros agentes cancerígenos conhecidos (Blusztajn & Zeisel, 1989).

2.2.3.4 Danos hepáticos induzidos por drogas

Diversas drogas e os metabólitos a estas associadas têm sido relacionados com a disfunção mitocondrial nos hepatócitos. Entre os diferentes mecanismos associados, encontra-se a indução o MPT nas mitocôndrias do fígado conduzindo à apoptose e/ ou necrose. As drogas também podem prejudicar a oxidação dos ácidos gordos na mitocôndria levando ao aumento de triglicerídeos no citoplasma dos hepatócitos. Embora possa haver acumulação de AGL, isto parece acontecer quando a oxidação dos ácidos gordos é inibida. Algumas drogas prejudicam diretamente a oxidação dos ácidos gordos através da inibição das enzimas da oxidação e/ ou pelo sequestro dos cofatores de oxidação. Outras, primeiro inibem a atividade da CRm, quer diretamente, quer como consequência do deterioramento da replicação do DNA mitocondrial ou da sua integridade. A inibição severa da cadeia respiratória leva à inibição da β -oxidação mitocondrial e pode provocar a depleção das reservas de ATP dentro dos hepatócitos levando-os à morte celular. Assim, a inibição severa da β -oxidação mitocondrial pode levar à esteatose microvesicular caracterizada pela presença de minúsculas gotículas lipídicas no plasma dos hepatócitos. Esta lesão grave do fígado pode ser associada à insuficiência hepática, hipoglicemia profunda e encefalopatia. A esteatose microvesicular pode levar à morte. A inibição menos severa e mais prolongada da β -oxidação mitocondrial pode causar esteatose macrovesicular caracterizada pela presença de um único vacúolo dentro do citoplasma dos hepatócitos e embora a esteatose macrovesicular seja benigna a curto prazo, ela poderá evoluir, em alguns pacientes, para esteatose hepática, após vários anos.

Um outro mecanismo possível para a lesão hepática induzida por drogas prende-se com a inibição das duas principais vias de remoção de gordura do fígado: a oxidação dos ácidos gordos e a secreção hepática de VLDL.

Normalmente, as drogas que induzem a esteatose hepática são compostos que debilitam a CRm provocando não só danos na oxidação dos ácidos gordos e esteatose, mas também reforça a produção de ERONS. Desta forma, a elevada produção de ERONS parece ser uma das chaves da patogénese da

esteatose hepática induzida por drogas (Labbe et al., 2008; Pessayre et al., 2010).

2.3 Alterações morfológicas, metabólicas e funcionais do fígado induzidas pela condição do envelhecimento

O envelhecimento é caracterizado pelo declínio geral da função fisiológica que leva à morbidade e mortalidade. Sendo um processo multifatorial complexo, há evidências de que o SO da idade seja a causa os danos celulares funcionais e estruturais de órgãos e tecidos como o fígado (Castillo et al., 2005; Molpeceres et al., 2007). O estado redox a célula é uma consequência o equilíbrio necessário entre os níveis de oxidantes e redutores equivalentes (Molpeceres et al., 2007).

A “Teoria os Radicais Livres” do envelhecimento propõe que o SO desempenha um papel fundamental no processo de envelhecimento. Este ocorre se as concentrações de EROS forem anormalmente elevadas. No entanto, as EROS não são apenas a causa dos danos estruturais mas também são mediadoras fisiológicas importantes nos processos e sinalização celular (Castillo et al., 2005; Kireev et al., 2007).

O fígado, um órgão envolvido no metabolismo e nos processos de desintoxicação, está bem estruturado com uma variedade de sistemas antioxidantes enzimáticos endógenos e não enzimáticos que são capazes, no início a vida, e neutralizar os radicais livres de oxigênio formados durante a atividade celular. Em particular, a dismutação o anião O_2 e a degradação do H_2O_2 , limitando os efeitos tóxicos dos metabólitos reativos de oxigênio.

As múltiplas funções atribuídas ao fígado e o seu papel na fisiologia humana sugerem que este órgão é particularmente suscetível às agressões derivadas do envelhecimento justificando desde modo o aumentando da incidência de patologias hepáticas devido ao comprometimento da função hepática em pessoas idosas (Molpeceres et al., 2007). Este fenómeno parece estar associado a alterações do estado redox que por sua vez conduz a um aumento

da produção de oxidantes e uma resposta inflamatória aumentada, sendo que o stress oxidativo é também ele um indutor da apoptose nos hepatócitos (Molpeceres et al., 2007). Os hepatócitos são muito ricos em mitocôndrias e têm uma frequência respiratória alta logo, são expostos a grandes quantidades de EROS e ao SO permanente. Além disso, as células hepáticas desempenham um papel crítico no metabolismo e estão constantemente expostas a agentes potencialmente nocivos e envolvidas nos processos de desintoxicação, já referido acima. Ora, a função mitocondrial diminui com a idade, diminui a atividade de várias enzimas e de alguns elementos da CTE, bem como diminui o $\Delta\Psi_m$ levando a uma diminuição do fornecimento de energia às células envelhecidas. Também há um aumento da produção de EROS com a idade, já mencionado, que leva ao aumento do dano oxidativo induzido aos lípidos, proteínas e DNA.

Com o envelhecimento também o sistema antioxidante é afetado. A GSH é o antioxidante intracelular mais importante sendo o fígado a sua principal fonte. Com a idade, também os níveis de GSH diminuem nos tecidos, incluindo o fígado, contribuindo, também, para o SO no envelhecimento (Castillo et al., 2005).

Como referido anteriormente, o fígado desempenha um papel importante na depuração de muitas drogas e o envelhecimento produz uma redução na sua função. Diminui o tamanho hepático, o fluxo de sangue e o metabolismo de algumas drogas, colesterol e ureia. A capacidade de regeneração dos hepatócitos também fica diminuída. A patogénese das alterações hepáticas observadas em pessoas idosas parece estar relacionada, não só com diminuição de certos processos metabólicos que levam à redução da produção de ATP mas também com a modificação de substâncias que participam nos processos de oxidação-redução tais como: NO, CO, GSH entre outras enzimas (Castillo et al., 2005; Kireev et al., 2007).

A apoptose é um processo ativo crítico para o desenvolvimento e manutenção de homeostasia celular, como já referido. Estudos sugerem que o envelhecimento é acompanhado de alterações na atividade das caspases, aumento dos níveis de apoptose e um automecanismo de proteção para

remover o aumento do número de células disfuncionais resultantes do envelhecimento e, devido à morte excessiva de células, conduz à disfunção dos órgãos (Molpeceres et al., 2007).

2.4 Agravamento do Envelhecimento induzido pelos marcadores relacionados com a saúde

O envelhecimento é um processo biológico natural, complexo e multifatorial associado à diminuição da função bioenergética, ao aumento do SO, à capacidade de resposta ao stress e ao aumento do risco de cancro e de doenças associadas à idade (Lee et al., 2009; Paradies et al., 2010).

Estudos clínicos recentes têm apontado a inflamação crónica como um fator de risco subjacente ao envelhecimento e às doenças relacionadas com a idade. Um dos mecanismos que desencadeia a inflamação crónica no envelhecimento é a alteração do estado redox. O seu desequilíbrio é provavelmente causado pelo enfraquecimento do sistema antioxidativo e contínua produção de ERONS e aldeídos lípidos reativos (Chung et al., 2009; Paradies et al., 2010). As EROS são resultantes do metabolismo oxidativo e são geradas continuamente. Mais de cem condições clínicas têm sido associadas à formação de EROS: síndrome metabólica, obesidade, doenças vasculares, osteoporose, diabetes, aterosclerose, cancro, demência, doenças autoimunes e envelhecimento (Chung et al., 2009; Paradies et al., 2010; Seidman, Khan, Bai, Shirwany, & Quirk, 2000). As EROS são extremamente reativas provocando um dano extenso nos tecidos e nas células de DNA. Exclusões específicas dentro do DNAmít ocorrem com frequência progressivamente maior com a idade e são resultado da exposição crónica a ERONS. Quando o DNA sofre danos excessivos, a célula torna-se bioenergeticamente deficiente sendo esta a base da “Teoria Mitocondrial do Envelhecimento” (Seidman et al., 2000). A “Teoria neuro endócrina” considera que os mecanismos biológicos atuam de uma forma coordenada e equilibrada, de modo que, quando um sistema é perturbado, muitos outros também o são. Por exemplo, a incapacidade funcional do sistema reprodutor feminino (menopausa), com a diminuição de

estrogénios, não afeta apenas a capacidade reprodutora feminina mas atinge também uma série de outras funções como a incontinência urinária, a absorção de nutrientes, o metabolismo ósseo e mineral, a pressão sanguínea e a função cardiovascular, a memória e a cognição, organização e expressão de ritmos diários e a progressão de doenças degenerativas relacionadas com a idade. Os desequilíbrios nos mecanismos biológicos causam perda de funcionalidade progressivamente com a idade e conduz, conseqüentemente, ao aumento da suscetibilidade e incidência de doenças, aumentando a probabilidade de morte (Mota, Figueiredo, & Duarte, 2004).

2.5 Doenças mitocondriais induzidas pelo envelhecimento

A disfunção mitocondrial está associada ao processo normal de envelhecimento em diversos tecidos como à etiologia de diversas doenças degenerativas no idoso (Mather & Rottenberg, 2000; Reddy, 2008). Ora cada célula tem uma centena de mitocôndrias e cada mitocôndria tem várias cópias de DNAmít sendo a acumulação de mutações somáticas deste um dos principais contribuintes do envelhecimento e das doenças degenerativas (Wallace, Brown, Melov, Graham, & Lott, 1998). A mitocôndria está intimamente envolvida no processo de envelhecimento porque este organelo é considerado a principal via intracelular da formação de EROS nomeadamente do $O_2^{\cdot-}$. As EROS produzidas na CRm atacam os constituintes mitocondriais incluindo proteínas, lípidos e DNAmít (Paradies et al., 2010). Assim, um conjunto de alterações na mitocôndria e no DNAmít tem sido observado no processo de envelhecimento: declínio da CRm, aumento da produção de EROS mitocondrial e extensão do dano oxidativo no DNA, proteínas e lípidos; acumulação de mutações pontuais e de exclusões em grande escala do DNAmít, conduzindo ao declínio da função bioenergética da célula, levando à apoptose (Paradies et al., 2010; Wallace et al., 1998). Os danos induzidos pelo SO levam à transcrição e translação de proteínas defeituosas predominantemente nas subunidades do complexo I da CRm induzindo, conseqüentemente, a disfunção da mesma (Boengler, Schulz, & Heusch,

2009). A disfunção mitocondrial, o SO avançado a acumulação subsequente de mutações no DNAmít na expressão de alguns conjuntos de genes e apoptose são importantes contribuintes do envelhecimento humano (Boengler et al., 2009; Wallace et al., 1998). Assim, o SO parece ser uma causa e não uma consequência do envelhecimento celular devendo ser considerado a sua marca (Sastre, Pallardo, & Vina, 2003). Este, conduz ao envelhecimento dos tecidos através da apoptose via mitocondrial existindo inúmeras características comuns ao envelhecimento e à apoptose tais como: diminuição do $\Delta\Psi_m$, oxidação da GPX e o dano oxidativo no DNAmít. Ambos mostram um aumento consistente no SO, níveis mais elevados de peróxidos lipídicos e um aumento da rutura peroxissomal (Sastre et al., 2003).

Uma grande variedade de mutações do DNAmít tem sido identificadas em doenças degenerativas do cérebro, coração, músculo esquelético, rins e sistema endócrino. Normalmente, os indivíduos que herdaram estas doenças mitocondriais são normais no nascimento e começam a desenvolver os sintomas durante a infância, meia-idade ou na velhice dependendo da gravidade da mutação do DNAmít herdado tendendo esta a evoluir progressivamente (Wallace et al., 1995). Esta característica comum nas doenças mitocondriais deve-se ao declínio da atividade enzimática da fosforilação oxidativa e da acumulação de mutações somáticas do DNAmít nos tecidos pós-mióticos com o aumento da idade. Quanto menor a capacidade inicial da fosforilação oxidativa ou mais rápida for a acumulação de mutações somáticas do DNAmít, a fosforilação oxidativa declina abaixo dos limiares bioenergéticos dos tecidos conduzindo à doença (Nicholls, 2002; Wallace et al., 1998).

2.6 Toxicidade hepática no envelhecimento induzida por drogas

A lesão mitocondrial é o maior mecanismo de lesão hepático (Begrache et al., 2011; Pessayre et al., 2010). Vários mecanismos levam à disfunção mitocondrial dos hepatócitos induzida por drogas: através da indução do PTP e

consequentemente, ao esgotamento severo das reservas de ATP levando à necrose hepática celular ou à apoptose através da libertação de proteínas pro-apoptóticas. A necrose e a apoptose podem desencadear a hepatite citosólica, levando, por vezes, a uma hepatite fulminante e letal em alguns pacientes (Pessayre et al., 2010).

Os fármacos e/ou seus metabólitos reativos podem causar hepatotoxicidade através de diferentes vias sendo a disfunção mitocondrial uma delas (Labbe et al., 2008). O hepatócito é especialmente vulnerável a lesões devido ao seu papel central no metabolismo dos xenobióticos, incluindo drogas, sendo os danos no fígado comuns na prática médica devido ao uso farmacológico das mesmas (Gores et al., 2010). A suscetibilidade do fígado a lesões induzidas por drogas é devida a características vasculares e metabólicas únicas: aproximadamente 75% do fluxo sanguíneo hepático vem diretamente das vísceras gastrointestinais e do baço através da veia portal e, os outros 25% vêm da artéria hepática. O sangue da veia portal é rico em produtos xenobióticos absorvidos no intestino e entregues ao fígado em concentrações elevadas. Este contém um complexo de enzimas de desintoxicação que, embora torne os xenobióticos inofensivos e facilite a sua eliminação, também têm o potencial de converter compostos químicos em compostos intermediários altamente reativos, podendo estes ser bastante prejudiciais para o fígado. Um exemplo de dano no fígado por este mecanismo é o paracetamol (Gores et al., 2010). Outro mecanismo é a formação extensa de metabólitos reativos que aumentam o Ca^{2+} citosólico que ao entrar na mitocôndria pode desencadear o PTP e a apoptose (Labbe et al., 2008). As drogas também podem prejudicar a β -oxidação mitocondrial levando à acumulação de triglicerídeos nos hepatócitos. A oxidação dos ácidos gordos é prejudicada de diferentes formas. Uns medicamentos prejudicam diretamente a β -oxidação inibindo as enzimas desta e/ ou pelo sequestro dos cofatores L-carnitina e a coenzima-A (Hassanein & Frederick, 2004; Labbe et al., 2008). Outros medicamentos, primeiro inibem a CRM, quer diretamente, quer como consequência dos efeitos prejudiciais sobre a replicação do DNAm e/ ou sua integridade. A inibição severa da β -oxidação pode levar à esteatose microvesicular, sendo esta lesão

potencialmente grave quando associada à insuficiência hepática, hipoglicemia profunda e encefalopatia (Begriche et al., 2011; Hassanein & Frederick, 2004; Labbe et al., 2008; Pessayre et al., 2010). No entanto, uma inibição menos severa mas, mais prolongada da β -oxidação mitocondrial pode causar esteatose macrovesicular que, embora benigna a curto prazo, poderá evoluir para esteatohepatite após vários anos e, até, cirrose. É de salientar que os medicamentos indutores da esteatohepatite geralmente são compostos que prejudicam a CRm causando, não apenas comprometimento da β -oxidação e esteatose mas também, o reforço da produção de EROS sendo este evento chave da patogénese da esteatohepatite induzida por drogas através da indução da peroxidação lipídica e, possivelmente, desencadeando a formação de citocinas pro-apoptóticas (TNF- α) e pró-fibróticas (TGF- β) pelas células Kuffer e outras células inflamatórias (Labbe et al., 2008). Mais ainda, a disfunção mitocondrial induzida por drogas também pode desencadear, quer manifestações extra-hepáticas diversas como acidose láctica, miopatia, pancreatite; quer lipoatrofia. Aos efeitos das drogas capazes de causar disfunção mitocondrial podem adicionar-se fatores genéticos, metabólicos e ambientais que prejudicam a função mitocondrial (Labbe et al., 2008). Alguns pacientes podem ter predisposição para a toxicidade mitocondrial a certas drogas devido a erros inatos dentro do genoma mitocondrial ou nas enzimas nucleares codificadas mitocondriais (Hassanein & Frederick, 2004). Também, a obesidade pode causar doença não alcoólica do fígado podendo tornar os obesos mais vulneráveis à hepatotoxicidade induzida por drogas (Labbe et al., 2008).

Vários estudos sugerem que a incidência e a gravidade da doença hepática induzida por drogas podem variar com a idade do paciente. A sensibilidade às drogas pode ser alterada na velhice devido a mudanças relacionadas com a farmacocinética e farmacodinâmica bem como a outros fatores como mudanças hormonais, imunológicas e estado nutricional. Além disso, a interação com múltiplos estados de doença e uma capacidade reduzida para reparar os tecidos pode agravar a lesão produzida pela exposição a produtos químicos tóxicos (Rikans & Hornbrook, 1997). Alterações patológicas na

estrutura e/ou função dos órgãos associadas ao envelhecimento podem afetar os normais processos fisiológicos como a predisposição às drogas (Schmucker, 2005).

A incidência de muitas doenças aumenta com a idade ocorrendo uma multimorbidade mais frequente o que torna os idosos mais vulneráveis aos efeitos colaterais indesejáveis das drogas (Zeeh, 2001). Alterações no metabolismo hepático na depuração das drogas podem ser atribuídas à idade pela redução do tamanho do fígado e do fluxo sanguíneo hepático, e a um declínio na concentração do RE liso com a sua diversidade de enzimas envolvidas no metabolismo dos esteróides, lípidos, hidratos de carbono e xenobióticos (Schmucker, 2005; Zeeh, 2001). A população idosa constitui o maior grupo de consumidores de drogas, ou seja, 65% desta população é medicada e com vários medicamentos. No entanto, com a exceção do declínio do volume do fígado e do fluxo sanguíneo, não há alterações óbvias na estrutura e função hepática relacionadas com a idade que pareçam comprometer a depuração das drogas (Schmucker, 2005).

2.7 Doenças nas mitocôndrias hepáticas induzidas pelo Salicilato

O comprometimento grave e prolongado da β -oxidação mitocondrial leva à esteatose microvesicular e com maior gravidade, à insuficiência hepática, coma ou morte. O comprometimento da função mitocondrial pode ser genético ou adquirido e variadas causas podem acrescentar efeitos prejudiciais inibindo severamente a β -oxidação. As drogas e alguns compostos endógenos podem sequestrar a CoA e/ou as enzimas da β -oxidação como a aspirina, o ácido valpróico e vários anti-inflamatórios (Fromenty & Pessayre, 1995). Estes podem inibir, quer a β -oxidação, quer a fosforilação oxidativa, ou podem prejudicar a transmissão do DNA mitocondrial ou diminuir a replicação do DNA. Outras drogas atuam através da combinação de diferentes mecanismos (Pessayre & Fromenty, 2005).

Os salicilatos e as drogas não esteroides, como o salicilato de sódio e a aspirina, são amplamente prescritos para tratar a inflamação. Estes têm efeitos prejudiciais sobre as mitocôndrias isoladas causando o desacoplamento da fosforilação oxidativa e tumefação (Battaglia et al., 2005). A aspirina é hidrolisada, por esterases específicas, em ácido salicílico, sendo esse ativado em salicylyl-CoA na membrana externa da mitocôndria. A formação extensa de salicylyl-CoA sequestra a CoAextra-mitochondrial a qual deixará de ser suficiente para ativar a cadeia longa dos ácidos gordos impedindo a sua entrada na mitocôndria para a β -oxidação (Hassanein & Frederick, 2004; Pessayre et al., 2010). Através da inibição da β -oxidação, o salicilato pode levar a esteatose microvesicular caracterizada pela presença de gotículas de gordura dentro do citoplasma dos hepatócitos (Labbe et al., 2008). A interação do salicilato com a CRM dos hepatócitos gera H_2O_2 e, muito provavelmente, outra EROS que, por sua vez, oxidam os grupos tiol e glutatona. Este SO leva à indução do PTP na presença do Ca^{2+} induzindo o aumento dos danos oxidativos resultando na diminuição da fosforilação oxidativa e da β -oxidação. A indução do PTP também induz a libertação do citocromo c e de fatores de indução apoptótica (Battaglia et al., 2005; Labbe et al., 2008). O grupo reativo do salicilato para a indução do SO é o grupo hidroxila que, interagindo com o Fe-S do complexo I, produz EROS. A aspirina e o salicilato afetam, também, a homeostasia do Ca^{2+} mitocondrial e agem sinergicamente com o catião prejudicando a CRM e a síntese do ATP (Battaglia et al., 2005). O último efeito poderia ser o envolvimento na morte irregular das células do fígado observada em pacientes que recebem doses terapêuticas elevadas de aspirina. Embora doses muito elevadas causem frequentemente esteatose microvesicular, as doses terapêuticas podem no entanto desencadear a síndrome de Reye em algumas crianças (raramente em adultos) associado comumente a infeções virais (Fromenty & Pessayre, 1995; Pessayre et al., 2010).

De facto, a aspirina tem sido apontada como uma contribuinte da síndrome de Reye nas crianças com síndromes virais, sendo a disfunção hepática com elevação das transaminases e esteatose hepática uma das características desta síndrome. Tem sido referido que os efeitos latentes da disfunção

mitocondrial, β -oxidação e ciclo da ureia, estão presentes nos pacientes que desenvolvem a síndrome de Reye com a aspirina a ser a “gota de água” para a descompensação da disfunção mitocondrial. Também, há um aumento das toxinas e do TNF- α contribuindo para a disfunção da CRm (Hassanein & Frederick, 2004).

3. Objetivos

3.1. Objetivo geral

O objetivo fundamental do presente estudo foi estudar o efeito do envelhecimento na resposta *in vitro* de mitocôndrias de fígado de rato à presença de salicilato, um anti-inflamatório indutor de disfunção hepática via ação mitocondrial.

3.2. Objetivos específicos

Podemos definir como objetivos específicos deste estudo a análise da resposta de populações mitocondriais de fígado de animais adultos vs. Idosos à ação do salicilato nos seguintes parâmetros clássicos do estudo da bioenergética mitocondrial:

- I. atividade respiratória mitocondrial;
- II. potencial da membrana mitocondrial;
- III. na tolerância mitocondrial à indução do PTP por cálcio e fosfato.

4. Metodologia

4.1. Caracterização da Amostra

A amostra deste estudo foi constituída por 6 ratos *Wistar* macho adultos com 19 semanas de idade e 5 ratos *Wistar* macho idosos com 106 semanas de idade, sendo que 17 semanas foi a idade considerada adequada para os controlos jovens e 106 semanas a idade adequada para avaliar as condições patológicas comuns observadas durante o envelhecimento (aumento dos marcadores de dano oxidativo, diminuição das hormonas anabólicas e a diminuição da capacidade antioxidante) (Garcia-Fernandez, Delgado, Puche, Gonzalez-Baron, & Castilla Cortazar, 2008) Durante o protocolo experimental os animais foram mantidos em gaiolas coletivas (um rato por gaiola) em biotério com atmosfera normal (21-22 C°; 50-60 % humidade), comida e água *ad libitum* e num ciclo de 12 h dia/noite.

4.2. Protocolo Experimental

4.2.1. Sacrifício dos animais, extrações do plasma e do fígado

Os animais foram anestesiados com uma mistura cetamina 90 mg/kg e 10 mg/kg xilazina. Após sacrifício por tração cervical, os animais foram decapitados tendo sido extraído sangue. O sangue foi recolhido e imediatamente centrifugado (5000xg durante 5 min a 4°C) e uma alíquota de plasma foi obtido e armazenado a -80°C para análises bioquímicas posteriores. De seguida, procedeu-se à rápida abertura da cavidade abdominal e torácica, o fígado foi rapidamente excisado, enxaguado, cuidadosamente seco e pesado.

4.2.2. Isolamento de mitocôndrias hepáticas

As mitocôndrias hepáticas foram preparadas usando os métodos convencionais de centrifugação diferencial. O fígado foi imediatamente excisado e delicadamente seccionado num meio de isolamento frio (4°C)

contendo 250 mM sacarose, 10 mM HEPES, 1 mM de EGTA (pH 7,4) e 0,1% BSA fat free.

Após lavagem, o fígado foi ressuspenso em 40 ml de meio de isolamento e mecanicamente homogeneizado. O homogeneizado foi centrifugado a 800xg durante 10 minutos e o sobrenadante resultante foi centrifugado a 10.000 xg durante 10 minutos. O sedimento, maioritariamente composto de mitocôndrias, foi ressuspenso usando um pincel e centrifugado duas vezes a 10.000 xg durante 10 minutos para obtenção da suspensão mitocondrial final. O EGTA e a BSA foram removidos do meio de lavagem final.

A concentração final de proteína mitocondrial foi determinada espectrofotometricamente pelo método do biureto utilizando BSA como padrão. As suspensões mitocondriais de fígado foram utilizadas durante 4 horas para os ensaios *in vitro* de avaliação de parâmetros associados ao consumo de oxigénio, potencial transmembranar e *swelling*, tendo sido mantidas em gelo (0-4°C) durante esse período.

4.2.3. Funcionalidade respiratória

A função respiratória mitocondrial foi avaliada polarograficamente, a 25°C, utilizando um elétrodo de oxigénio tipo Clark (Hansatech DW 1, Norfolk, Reino Unido). As reações ocorreram numa câmara de vidro de 2ml de volume, agitada magneticamente, contendo 0,5 mg de proteína mitocondrial num meio de respiração contendo 130mM de sacarose, 50 mM de KCl, 5 mM de HEPES, 2,5 mM de KH₂PO₄, 2,5 mM de MgCl₂, 0,1 mM de EGTA, pH 7,4. Após um período de 1 minuto equilibração do sistema, a respiração mitocondrial foi iniciada pela adição de glutamato/malato (10 e 5 mM, respetivamente). O estado 3 da respiração mitocondrial foi determinado após a adição de 105µM ADP; o estado 4 respiratório foi medido como a taxa de consumo de oxigénio após fosforilação do ADP adicionado. O RCR (rácio entre o estado 3 e estado 4) e os rácios ADP/O (o número de nmol de ADP fosforilado por nmol O₂ consumido) foram calculados considerando o valor de 474 ngatom O/ml para a

solubilidade do oxigênio a 25°C em água duplamente destilada. Nos ensaios realizados na presença de salicilato, este foi adicionado à suspensão no estado basal numa concentração final de 0,5 mM.

4.2.4 Determinação do potencial elétrico transmembranar ($\Delta\Psi$)

O $\Delta\Psi$ de membrana foi estimado com base na atividade do catião lipofílico tetrafenilfosfônio (TPP⁺) utilizando um eletrodo seletivo para TPP⁺ preparado no nosso laboratório de acordo com Kamo, (Kamo, Muratsugu, Hongoh, & Kobatake, 1979) e usando como referência um eletrodo AgCL (Tacussel, Model MI 402). Ambos os eletrodos TPP⁺ e o de referência foram inseridos numa câmara aberta agitada magneticamente e conectada a um medidor de pH (Ortec, PHM 84). Os sinais foram ampliados através de um gravador potenciométrico (Allteck, Linear1200). Não foi utilizado qualquer fator de correção para retificar a contribuição passiva de TPP⁺ para o potencial de membrana, uma vez que o propósito deste estudo é observar as alterações relativas em detrimento de valores absolutos. Consequentemente, os valores de $\Delta\Psi$ obtidos *à priori* são ligeiramente sobrestimados. O $\Delta\Psi$ foi estimado através da equação (25 °C): $\Delta\Psi = 59 \times \log (v/V) - 59 \times \log (10 \Delta E/59-1)$

Legenda:

v – volume mitocondrial

V – volume do meio de incubação

ΔE –deflexão do potencial do eletrodo a partir do estado basal

Um volume de matriz mitocondrial de 1,1 µl/mg de proteína foi assumido. As reações foram realizadas em 2 ml de tampão de reação contendo 130mM de sacarose, 50 mM de KCl, 5 mM de HEPES, 2,5 mM de KH₂PO₄, 2,5 mM de MgCl₂, 0,1 mM de EGTA, pH 7,4, suplementado com 3 µM de TPP⁺ e 0,5 mg/ml de proteína com a temperatura mantida a 25°C. A avaliação do $\Delta\Psi$ foi realizada utilizando substratos para o complexo I (10 mM de glutamato e 5 mM de malato). Foi utilizado ADP (105 µM - 210nmol) para induzir um ciclo fosforilativo. A fase de latência, que reflete o tempo necessário para fosforilar o

ADP adicionado, foi também medida. Quando aplicável, foi adicionado salicilato à suspensão numa concentração final de 0,5 mM.

Adicionalmente, foi registada e avaliada a queda de $\Delta\psi$ da suspensão energizada a cada 5 minutos durante 20 minutos com e sem incubação com salicilato (0,5 mM).

4.2.5 Determinação do *swelling* mitocondrial durante a indução PPT

Estudos anteriores sobre regulação da MPTP mostraram menor capacidade de retenção de cálcio com substratos para o complexo I em comparação com substratos para o complexo II devido ao facto de que o fluxo de eletrões pode atuar como um sensibilizador potente de poro independentemente de outros reguladores, tais como o estado redox dos nucleotídeos de piridina, $\Delta\psi$, pH e produção de ROS. Assim, decidiu-se avaliar a indução MPTP com succinato como substrato. As alterações osmóticas mitocondriais foram seguidas por monitorização da diminuição de absorvância a 540 nm utilizando um espectrofotómetro Jasco V-630. A amplitude de *swelling* após a adição de cálcio foi considerada para avaliação da suscetibilidade à abertura do PPT. A reação foi continuamente agitada e a temperatura foi mantida a 25°C. Os ensaios foram realizados em 1 ml de meio de reação contendo 200 mM de sacarose, 10 mM de HEPES, 10 μ M de EGTA, 1 mM de KH₂PO₄, pH 7,4, suplementado com rotenona 4 μ M, succinato 10 mM e um único pulso de 80 nmol de cálcio com 0,5 mg/ml de proteína. Ensaio de controlo negativo foram realizados na presença de ciclosporina A (1 mM), um inibidor seletivo do PPT.

4.3. Procedimentos estatísticos

O tratamento estatístico dos dados foi realizado recorrendo ao programa *Statistical Package for the Social Sciences* (SPSS Inc. version 14.0 para Windows).

Para a comparação de médias foram utilizados os testes paramétricos, *PairedSample t-test*. O nível de significância foi estabelecido em 5 %.

5. Resultados

A tabela 1 apresenta a idade, os valores médios e respetivo desvio padrão do peso corporal, o peso do fígado, relação entre o peso do fígado e o peso corporal e de alguns marcadores plasmáticos : GTP/ALT, GGT, glucose, ureia, creatinina, ácido úrico, triglicerídeos, colesterol, HDL, proteína reativa C determinados nos animais adultos e dos animais velhos.

Tabela 1: Estudo animal

	Adulto	Velho
Idade (semanas)	19	106
Peso corporal	510.8±14.6	657,3±36,6*
Peso do fígado	14.6±0.8	16,1±0,8
Peso do fígado / Peso corporal	28.6±1.5	25,9±1.8
Plasma		
GPT/ALT (U/L)	42,5±4,6	47,6±6,2
GGT (U/L)	1,2±0,3	0,4±0,2
Glucose (g/L)	268,8±9,9	199,2±29*
Ureia (g/L)	36,17±0,54	96,4±68,65
Creatinina (mg/L)	0,45±0,02	0,72±0,35
Ácido úrico (mg/L)	0,95±0,11	0,46±0,1*
Triglicerídeos (g/L)	107,2±6,6	130,9±29,8
Colesterol (g/L)	54,5±5,5	121,4±20,5*
HDL (g/L)	32,83±2,89	71,6±11,5*
Proteína reativa- C	0,02±0,01	0,02±0,01

Valores médios ± S.E.M ou SD mas a abreviatura terá que ser em português. p<0.05 vs. adulto.

Pela análise do quadro verificou-se que os animais do grupo de idosos apresentavam um peso superior relativamente aos animais adultos. A análise dos marcadores plasmáticos revelou um nível inferior de glicose e de ácido úrico e um valor superior de triglicerídeos, colesterol e HDL nos animais envelhecidos. Relativamente ao peso do fígado e aos outros marcadores

plasmáticos analisados, não se verificaram alterações significativas entre os grupos.

A tabela 2 apresenta os parâmetros respiratórios das mitocôndrias hepáticas isoladas do grupo adulto e do grupo envelhecido.

Utilizando o glutamato-malato como substrato para energizar os complexo I da cadeia transportadora de elétrons e na ausência de salicilato (veículo), não se observaram diferenças significativas entre grupos relativamente aos parâmetros de funcionalidade mitocondrial avaliados. A incubação com salicilato induziu um aumento significativo do estado 2 no grupo adulto e uma tendência de incremento no grupo idoso. Foi observada em ambos os grupos uma diminuição significativa do RCR induzida pela ação do salicilato. O aumento do estado 2 no grupo de animais velhos foi significativamente inferior ao do grupo adulto.

Tabela 2: Valores médios \pm S.E.M. da taxa respiratória em estado 2, estado 3, estado 4 e RCR, usando como substrato o glutamato-malato (10/5mM) e na presença de veículo e de salicilato (0,5mM)

Glutamato-Malato	Veículo		Salicilato	
	Adulto	Velho	Adulto	Velho
Estado 2 (natomO.min ⁻¹ .mg.prot ⁻¹)	8.6 \pm 1.8	8.2 \pm 0.8	15.7 \pm 0.8#	12 \pm 1.3*
Estado 3 (natomO.min ⁻¹ .mg.prot ⁻¹)	41 \pm 3.5	36.5 \pm 5.6	41.1 \pm 3.4	33.8 \pm 5.6
Estado 4 (natomO.min ⁻¹ .mg.prot ⁻¹)	6.8 \pm 0.6	5.0 \pm 0.6	9.2 \pm 0.6	7.1 \pm 1
RCR	5.9 \pm 1.1	4.7 \pm 0.8	2.7 \pm 0.2#	2.9 \pm 0.4#
ADP/O	2.8 \pm 0.1	2.4 \pm 0.3	2.7 \pm 0.1	2.6 \pm 0.1

* p<0,05 vs. adulto, # p<0,05 vs. veículo.

A tabela 3 apresenta as flutuações do potencial transmembranar ($\Delta\Psi$) e da *lag phase* das mitocôndrias hepáticas isoladas, na presença e na ausência de salicilato, do grupo adulto e do grupo envelhecido.

Foram observadas diminuições significativas no $\Delta\Psi$ máximo, de despolarização e de repolarização nos grupos adulto e envelhecido na presença do salicilato quando comparados com a condição veículo. A *lag*

phase aumentou quer no grupo envelhecido em ambas as condições (fármaco e veículo) em comparação com as respectivas condições no grupo adulto.

Tabela 3: Flutuações do potencial transmembranar mitocondrial ($\Delta\Psi$) e da *lag phase*, usando com substrato o glutamato-malato (10/5mM), das mitocôndrias hepáticas isoladas do grupo adulto e do grupo envelhecido, na presença e ausência de salicilato (0.5mM).

	Veículo		Salicilato	
	Adulto	Velho	Adulto	Velho
Glutamato-malato				
Máximo $\Delta\Psi$ (- mV)	228.6 \pm 2	221.6 \pm 3.8	217.3 \pm 1.6#	209.7 \pm 4#
Despolarização ADP $\Delta\Psi$ (- mV)	202.9 \pm 2.2	196.9 \pm 3	197.5 \pm 2#	192.3 \pm 3#
Repolarização $\Delta\Psi$ (- mV)	224.0 \pm 1.9	216.5 \pm 3.9	214.6 \pm 1.7#	207.1 \pm 4.2#
Lag phase (s)	125 \pm 8.8	228 \pm 37.5*	134.4 \pm 8.5#	199.9 \pm 15.7*

* p<0,05 vs. adulto, # p<0,05 vs. veículo.

A tabela 4 mostra o decréscimo em mV do potencial de membrana ausência (veículo) e na presença de salicilato, a cada 5 minutos durante 20 minutos.

Tabela 4: Colapso do potencial transmembranar mitocondrial medido na ausência (veículo) e na presença do salicilato.

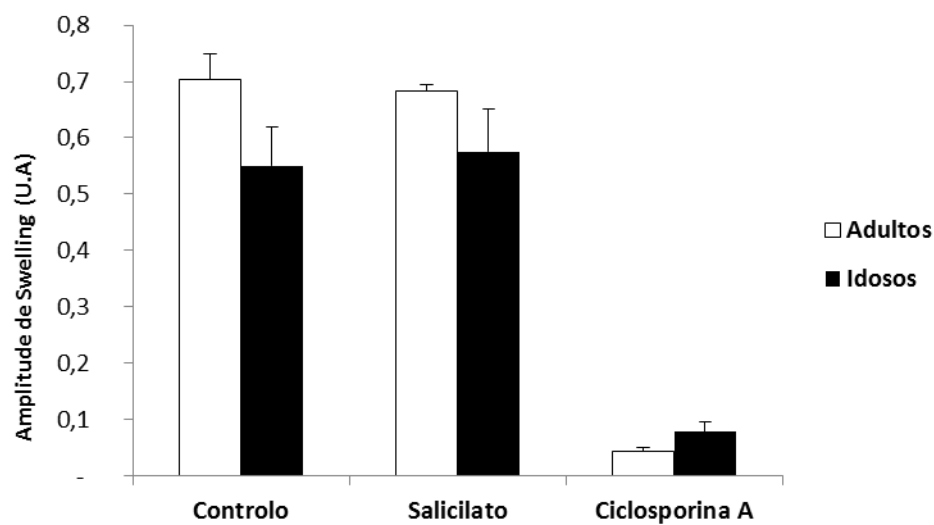
Glutamato-Malato	Veículo		Salicilato	
	Adulto	Velho	Adulto	Velho
[5 - 0 min]	15,6 \pm 2,3	15,9 \pm 1,5	39,5 \pm 8,7#	37,2 \pm 2,3#
[10 - 5 min]	5,9 \pm 1,3	7,6 \pm 2,6	12,2 \pm 1,0#	14,6 \pm 1,6#
[15 - 10 min]	5,1 \pm 1,1	6,5 \pm 2,6	27,5 \pm 19,2#	10,24 \pm 2,6#
[20 - 15 min]	5,7 \pm 1	5,7 \pm 2,2	6,5 \pm 1,8	16,1 \pm 4,3#*

* p<0,05 vs. adulto, # p<0,05 vs. veículo.

A incubação com salicilato induziu uma diminuição significativa do potencial de membrana em ambos os grupos em todos os momentos temporais analisados (com exceção 20 – 15 min no grupo adulto). Na presença de salicilato, foram observadas alterações significativas do potencial transmembranar entre os grupos entre os 15' e 20'

O gráfico 1 mostra os resultados relativos ao *swelling* mitocondrial indicador da indução do PPT por ação de cálcio, na ausência e na presença de salicilato. Não foram observadas quaisquer alterações significativas nos dois grupos em nenhuma das circunstâncias analisadas.

Gráfico 1: Evolução do *swelling* mitocondrial durante a indução do PPT das mitocondrias hepáticas na presença e na ausência de salicilato nos grupos adulto e envelhecido.



Os dados são médias \pm SEM das mitocôndrias hepáticas (proteína 0.5mg/mL) obtidas a partir de diferentes preparações mitocondriais para cada grupo experimental. A absorvância de suspensão mitocondrial foi seguida a 540 nm. As mitocôndrias foram incubadas como foi descrito na secção Métodos. Um único pulso de cálcio (35 μ M) foi adicionado para induzir o PPT sensível a ciclosporina-A,

6. Discussão dos resultados

A disfunção hepática é comum em pessoas idosas devido ao aumento da incidência de patologias hepáticas resultantes do papel da fisiologia humana atribuída ao fígado (Molpeceres et al., 2007). O hepatócito é especialmente vulnerável a lesões devido ao seu papel central no metabolismo dos xenobióticos, incluindo drogas (Gores et al., 2010).

O salicilato, principal metabolito da aspirina, apesar de ser amplamente prescrito para tratar a inflamação (Battaglia et al., 2005), pode originar esteatose microvesicular, estando na origem das lesões hepáticas (Labbe et al., 2008).

Com este estudo pretendeu perceber se o envelhecimento agrava a disfunção mitocondrial induzida pelo salicilato.

A amostra foi constituída por ratos, sendo que este parece ser o animal mais adequado no estudo de alterações estruturais e funcionais observadas em pacientes (Monti, Prosperi, Supino, & Bottiroli, 1995).

Com este objetivo, foram realizados ensaios *in vitro* e mediu-se o consumo de oxigénio, o potencial transmembranar e o *swelling* mitocondrial em mitocôndrias isoladas do fígado. Neste sentido, os ensaios em mitocôndrias isoladas constituem um modelo bastante utilizado para avaliar o efeito modulador de vários estímulos e/ou da toxicidade de algumas drogas como o salicilato, revelando-se como importantes sensores de toxicidade e/ou resposta tecidual a condições patofisiológicas (Oliveira, 2011).

O envelhecimento está associado a um aumento do peso corporal e da massa gorda, uma consequência da grande ingestão alimentar e de estilo de vida sedentário (Gupta et al., 2000). Em média, a massa muscular diminui com a idade sendo substituída por gordura ao longo do tempo. O aumento da infiltração de gordura no tecido muscular está associado ao decréscimo da força muscular (Alley, Ferrucci, Barbagallo, Studenski, & Harris, 2008). Esta tendência de aumento de peso é mais comum nos homens do que nas mulheres havendo uma redistribuição da gordura pela zona abdominal refletindo um aumento da gordura visceral com a idade (Harris, 2002). No

presente estudo, e apesar do peso corporal do grupo envelhecido ser significativamente superior, o peso do fígado assim como o rácio entre peso do fígado/ peso corporal não revelaram diferenças significativas.

Há referências a que os níveis plasmáticos de insulina, em jejum, são elevados quer em seres humanos, quer em ratos com o envelhecimento devido à disfunção/ falha da supressão da produção de glicose hepática (Gupta et al., 2000). Na amostra do estudo observam-se valores de glicose significativamente superiores aos do grupo adulto. Também os níveis de colesterol plasmático são mais elevados, sendo esta uma característica do envelhecimento devido à capacidade de remoção do colesterol através da conversão em ácidos biliares estar progressivamente reduzida com a idade (Parini, Angelin, & Rudling, 1999).

Os hepatócitos são muito ricos em mitocôndrias e têm uma função respiratória elevada, estando expostos a grandes quantidades de EROS e ao stress oxidativo permanente. Também, a função mitocondrial diminui com a idade assim como a atividade de várias enzimas e de alguns elementos da CTE, bem como o $\Delta\Psi_m$ levando a uma diminuição do fornecimento de energia às células envelhecidas (Castillo et al., 2005).

Para avaliar os efeitos do salicilato avaliamos o consumo de O_2 associado ao $\Delta\Psi_m$ e ciclos fosforilativos induzidos pelo ADP. O ADP é um estimulador da fosforilação oxidativa. Assim sendo, a análise dos parâmetros respiratórios estudados: estado 2, estado 3, estado 4 e o RCR com o substrato glutamato-malato permitiu-nos identificar e localizar o dano e a disfunção causada pelo estímulo *in vitro* (Ascensao et al., 2005). O RCR é um parâmetro importante da funcionalidade e da integridade estrutural das mitocôndrias, bem como uma medida de dependência da taxa respiratória da síntese do ATP (Adam-Vizi & Chinopoulos, 2006; Ascensao et al., 2005). Neste estudo verificou-se que o salicilato afetou a atividade respiratória no estado 2 do grupo envelhecido quando comparado como o grupo adulto, na presença do salicilato, e do grupo adulto na presença do salicilato. Nos estados 3 e 4 não se verificaram alterações significativas. Assim, os resultados demonstraram que há, realmente, uma ligeira diminuição da funcionalidade da CRM no estado 2 no

grupo envelhecido como o demonstrado por (Paradies et al., 2010). A diminuição do RCR em ambos os grupos, na presença do salicilato corrobora o descrito por Battaglia et al (Battaglia et al., 2005), que salientam os efeitos prejudiciais do salicilato como causa do desacoplamento da fosforilação oxidativa. A interação do salicilato com a CRM do fígado é passível de formar peróxido de hidrogénio e outras ROS, que por sua vez, podem interagir com outras biomoléculas e oxidando-as e em caso de desequilíbrio redox provocar stress oxidativo. O stress oxidativo por sua vez tem sido associado à indução do PPT na presença do Ca^{2+} (Battaglia et al., 2005), podendo levar ao desacoplamento da fosforilação oxidativa, e, consequentemente, à diminuição da síntese de ATP (Katz, Curry, Brooks, & Gerkin, 2004) . Tal como observado por Fromenty & Pessaryre, (1995), neste estudo o salicilato tem efeitos na permeabilidade da membrana interna mitocondrial e na fosforilação oxidativa observada demonstrada pela diminuição do RCR nos grupos adultos e envelhecidos.

O estudo complementar do $\Delta\Psi_m$ parece ser importante para a análise integrada da função mitocondrial uma vez que reflete as relações energéticas básicas na manutenção da homeostasia celular. De acordo os resultados (tabela 3), o salicilato afeta o $\Delta\Psi_m$ máximo usando como substrato o glutamato-malato, assim como, as flutuações associadas ao ciclo fosforilativo (despolarização e repolarização); isto quer no grupo adulto, quer no grupo envelhecido. A análise do $\Delta\Psi_m$ máximo é fundamental para percebermos a eficiência do ciclo fosforilativo. Neste caso e apesar da diminuição, nenhum dos grupos registou um $\Delta\Psi_m$ máximo inferior a 200 mV e, como tal, dificilmente a bioenergética mitocondrial estaria comprometida (Nadtochiy, Tompkins, & Brookes, 2006).

A *lag phase* é um indicador da capacidade mitocondrial em recuperar rapidamente após a adição do ADP, isto é, avalia o tempo que as mitocôndrias demoram a readquirir o potencial após a adição do ADP para induzir o ciclo fosforilativo. A *lag phase* nos grupos adulto e envelhecido sem salicilato foi significativamente diferente sendo a do grupo envelhecido superior. A *lag phase* do grupo envelhecido na presença do salicilato diminui relativamente ao

grupo envelhecido sem salicilato. Estes resultados sugerem que o grupo envelhecido apresenta um menor tempo para o restabelecimento do $\Delta\Psi_m$, logo, é mais eficaz a fosforilar o ADP na presença do salicilato.

O $\Delta\Psi_m$ é um evento crítico para a normal funcionalidade mitocondrial e energia das células estando associado ao estabelecimento de uma força motriz necessária para o eficiente movimento de elétrons e à formação do ATP através da fosforilação oxidativa. Várias doenças degenerativas foram ligadas ao colapso do $\Delta\Psi_m$ e, secundariamente, ao stress oxidativo associado ao envelhecimento (Lyon et al., 2010), podendo esta ser uma explicação possível para o observado no decorrer dos ensaios.

A mitocôndria é uma mediadora da apoptose celular sendo esta a chave do mecanismo de lesão hepática (Hassanein & Frederick, 2004; Pessayre et al., 2002). As mitocôndrias sofrem grandes mudanças na integridade das membranas antes dos sinais clássicos de morte celular. Se por um lado, a membrana externa faz com que haja a redistribuição de fatores apoptóticos, por outro lado, a permeabilização da membrana interna provoca perturbações no $\Delta\Psi_m$ sendo este indispensável para o funcionamento da ATP-sintetase, que fosforila ADP em ATP, portanto, a perda do $\Delta\Psi_m$ significa diminuição da produção de ATP (Shirakata & Koike, 2003). No presente estudo, apenas se verificaram alterações significativas do $\Delta\Psi_m$ entre os quinze e vinte minutos e apenas no grupo envelhecido, na presença do salicilato quando comparado com o grupo adulto também na presença do salicilato.

Diversos autores defendem que os fármacos (Begrache et al., 2011; Labbe et al., 2008) e em especial o salicilato (Al-Nasser, 1999; Battaglia et al., 2005) induzem a abertura do poro PPTm. Tem sido descrito que uma das características do PPTm, após a perda do $\Delta\Psi_m$, está relacionada com a amplitude de *swelling* induzido pelo Ca^{2+} na presença do fosfato (Gunter, Buntinas, Sparagna, Eliseev, & Gunter, 2000). No estudo não se verificaram alterações significativas na amplitude do *swelling* mitocondrial observando-se, no entanto, um ligeiro aumento no grupo envelhecido, na presença do salicilato. De facto, segundo (Battaglia et al., 2005), a amplitude de *swelling* tende a ser maior na presença do salicilato relativamente ao ensaio efetuado

na ausência do mesmo, reforçando a afirmação de diversos autores de que o salicilato induz o PPTm (Al-Nasser, 1999; Battaglia et al., 2005; Oh, Qian, Brenner, & Lemasters, 2003; Trost & Lemasters, 1997).

Uma vez que o presente trabalho será apresentado com vista à obtenção do 2º ciclo em Atividade Física para a Terceira Idade, interessa ainda que, de forma especulativa, nos refiramos ao hipotético papel que o exercício físico e/ou a atividade física poderia ter na modelação da função mitocondrial hepática de animais idosos, bem como na resposta à presença do fármaco no contexto do nosso estudo. Efetivamente, vários têm sido os trabalhos na literatura que mostraram que o exercício físico, particularmente com carácter crónico, aumenta a resistência tecidual a estímulos deletérios, diminuindo a exuberância do stress e lesão oxidativos e aumentando a resistência à indução da morte celular por apoptose (Ascensao et al., 2010; Ascensao & Magalhaes, 2006). Estes trabalhos têm sido centrados, fundamentalmente, nos tecidos muscular esquelético e cardíaco e têm, igualmente, mostrado um papel central da bioenergética e metabolismo mitocondriais na tolerância conferida pelo exercício. Assim sendo, e apesar do fígado ser um órgão sem capacidade contráctil e portanto, não submetido à ação de estímulos mecânicos, é possível a prática de exercício exerça efeitos modeladores importantes na funcionalidade deste tecido. De facto, vários têm sido os relatos de melhoria da função hepática e mitocondrial induzidos pelo exercício, quer em condições basais (Boveris & Navarro, 2008; Liu et al., 2000; Radak, Chung, & Goto, 2008), quer em animais portadores de patologia e disfunção hepática, e.g. por esteatose (Rector & Thyfault, 2011; Rector et al., 2008a; Rector et al., 2008b; Thyfault et al., 2009).

7. Conclusão

O presente estudo fornece dados originais para a compreensão da resposta mitocondrial hepática em animais envelhecidos à presença de salicilato.

Os resultados obtidos mostram que o salicilato tem efeitos prejudiciais na função mitocondrial, levando ao desacoplamento da fosforilação oxidativa uma vez que afetou a atividade respiratória no estado 2 do grupo envelhecido e provocou uma diminuição do RCR em ambos os grupos. O $\Delta\Psi_m$ máximo, de despolarização e repolarização, registou alterações significativas no grupo adulto e no envelhecido quando comparado com as condições de controlo para ambos os grupos. Contrariamente ao exposto anteriormente, a *lag phase* do grupo envelhecido na presença do salicilato diminuiu em relação ao grupo envelhecido de controlo sendo mais eficaz a fosforilar o ADP.

Em suma, os nossos resultados relativos à *lag phase* do ADP e ao estado 2 parecem sugerir que o envelhecimento poderá induzir um conjunto de adaptações celulares e mitocondriais em alguns sistemas de defesa que permitem uma preservação da função na presença de salicilato.

Bibliografia

- Adam-Vizi, V., & Chinopoulos, C. 2006. Bioenergetics and the formation of mitochondrial reactive oxygen species. *Trends in pharmacological sciences*, 27(12): 639-645.
- Al-Nasser, I. A. 1999. Salicylate-induced kidney mitochondrial permeability transition is prevented by cyclosporin A. *Toxicology letters*, 105(1): 1-8.
- Alley, D. E., Ferrucci, L., Barbagallo, M., Studenski, S. A., & Harris, T. B. 2008. A research agenda: the changing relationship between body weight and health in aging. *The journals of gerontology. Series A, Biological sciences and medical sciences*, 63(11): 1257-1259.
- Ariz, U., Mato, J. M., Lu, S. C., & Martinez Chantar, M. L. 2010. Nonalcoholic steatohepatitis, animal models, and biomarkers: what is new? *Methods in molecular biology*, 593: 109-136.
- Ascensao, A., Lumini-Oliveira, J., Machado, N. G., Ferreira, R. M., Goncalves, I. O., Moreira, A. C., Marques, F., Sardao, V. A., Oliveira, P. J., & Magalhaes, J. 2010. Acute exercise protects against calcium-induced cardiac mitochondrial permeability transition pore opening in doxorubicin-treated rats. *Clin Sci (Lond)*, 120(1): 37-49.
- Ascensao, A., Lumini-Oliveira, J., Oliveira, P. J., & Magalhaes, J. 2011. Mitochondria as a Target for Exercise-Induced Cardioprotection. *Curr Drug Targets*.
- Ascensao, A., & Magalhaes, J. 2006. Exercise and mitochondrial function in striated muscle. In A. J. Moreno, P. J. Oliveira, & M. C. Palmeira (Eds.), *Mitochondrial Pharmacology and Toxicology*: 237-270. Kerala: Transworld Research Network.
- Ascensao, A., Magalhaes, J., Soares, J., Oliveira, J., & Duarte, J. A. 2003. Exercise and cardiac oxidative stress. *Rev Port Cardiol*, 22(5): 651-678.
- Ascensao, A. A., Magalhaes, J. F., Soares, J. M., Ferreira, R. M., Neuparth, M. J., Appell, H. J., & Duarte, J. A. 2005. Cardiac mitochondrial respiratory function and oxidative stress: the role of exercise. *Int J Sports Med*, 26(4): 258-267.
- Balistreri, C. R., Caruso, C., & Candore, G. 2010. The role of adipose tissue and adipokines in obesity-related inflammatory diseases. *Mediators Inflamm*, 2010: 802078.
- Ballard, J. W. O., & Whitlock, M. C. 2004. The incomplete natural history of mitochondria. *Molecular Ecology*, 13(4): 729-744.
- Battaglia, V., Salvi, M., & Toninello, A. 2005. Oxidative stress is responsible for mitochondrial permeability transition induction by salicylate in liver mitochondria. *The Journal of biological chemistry*, 280(40): 33864-33872.
- Beere, H. M., Wolf, B. B., Cain, K., Mosser, D. D., Mahboubi, A., Kuwana, T., Tailor, P., Morimoto, R. I., Cohen, G. M., & Green, D. R. 2000. Heat-shock protein 70 inhibits apoptosis by preventing recruitment of procaspase-9 to the Apaf-1 apoptosome. *Nat Cell Biol*, 2(8): 469-475.
- Begriche, K., Igoudjil, A., Pessayre, D., & Fromenty, B. 2006. Mitochondrial dysfunction in NASH: causes, consequences and possible means to prevent it. *Mitochondrion*, 6(1): 1-28.
- Begriche, K., Massart, J., Robin, M. A., Borgne-Sanchez, A., & Fromenty, B. 2011. Drug-induced toxicity on mitochondria and lipid metabolism: mechanistic diversity and deleterious consequences for the liver. *J Hepatol*, 54(4): 773-794.

- Blusztajn, J. K., & Zeisel, S. H. 1989. 1,2-sn-diacylglycerol accumulates in choline-deficient liver. A possible mechanism of hepatic carcinogenesis via alteration in protein kinase C activity? *FEBS letters*, 243(2): 267-270.
- Boengler, K., Schulz, R., & Heusch, G. 2009. Loss of cardioprotection with ageing. *Cardiovascular research*, 83(2): 247-261.
- Boveris, A., & Navarro, A. 2008. Systemic and mitochondrial adaptive responses to moderate exercise in rodents. *Free radical biology & medicine*, 44(2): 224-229.
- Brookes, P. S., Yoon, Y., Robotham, J. L., Anders, M. W., & Sheu, S. S. 2004. Calcium, ATP, and ROS: a mitochondrial love-hate triangle. *Am J Physiol Cell Physiol*, 287(4): C817-833.
- Brown, G. C., & Borutaite, V. 2011. There is no evidence that mitochondria are the main source of reactive oxygen species in mammalian cells. *Mitochondrion*.
- Castillo, C., Salazar, V., Ariznavarreta, C., Fossati, M., Tresguerres, J. A., & Vara, E. 2005. Effect of S-adenosylmethionine on age-induced hepatocyte damage in old Wistar rats. *Biogerontology*, 6(5): 313-323.
- Chung, H. Y., Cesari, M., Anton, S., Marzetti, E., Giovannini, S., Seo, A. Y., Carter, C., Yu, B. P., & Leeuwenburgh, C. 2009. Molecular inflammation: underpinnings of aging and age-related diseases. *Ageing research reviews*, 8(1): 18-30.
- Desagher, S., & Martinou, J. C. 2000. Mitochondria as the central control point of apoptosis. *Trends Cell Biol*, 10(9): 369-377.
- Duchen, M. R. 2004. Roles of mitochondria in health and disease. *Diabetes*, 53: S96-S102.
- Fabbrini, E., Sullivan, S., & Klein, S. 2010. Obesity and Nonalcoholic Fatty Liver Disease: Biochemical, Metabolic, and Clinical Implications. *Hepatology*, 51(2): 679-689.
- Fan, J. G., & Qiao, L. 2009. Commonly used animal models of non-alcoholic steatohepatitis. *Hepatobiliary & pancreatic diseases international : HBPD INT*, 8(3): 233-240.
- Feissner, R. F., Skalska, J., Gaum, W. E., & Sheu, S. S. 2009. Crosstalk signaling between mitochondrial Ca²⁺ and ROS. *Front Biosci*, 14: 1197-1218.
- Fromenty, B., & Pessayre, D. 1995. Inhibition of mitochondrial beta-oxidation as a mechanism of hepatotoxicity. *Pharmacology & Therapeutics*, 67(1): 101-154.
- Fromenty, B., Robin, M. A., Igoudjil, A., Mansouri, A., & Pessayre, D. 2004. The ins and outs of mitochondrial dysfunction in NASH. *Diabetes Metab*, 30(2): 121-138.
- Garcia-Fernandez, M., Delgado, G., Puche, J. E., Gonzalez-Baron, S., & Castilla Cortazar, I. 2008. Low doses of insulin-like growth factor I improve insulin resistance, lipid metabolism, and oxidative damage in aging rats. *Endocrinology*, 149(5): 2433-2442.
- Gores, G. J., Malhi, H., & Guicciardi, M. E. 2010. Hepatocyte Death: A Clear and Present Danger. *Physiological Reviews*, 90(3): 1165-1194.
- Grattagliano, I., Russmann, S., Diogo, C. V., Bonfrate, L., Oliveira, P. J., Wang, D. Q., & Portincasa, P. 2011. Mitochondria in Chronic Liver Disease. *Curr Drug Targets*.
- Grundy, S. M. 2000. Metabolic complications of obesity. *Endocrine*, 13(2): 155-165.
- Gunter, T. E., Buntinas, L., Sparagna, G., Eliseev, R., & Gunter, K. 2000. Mitochondrial calcium transport: mechanisms and functions. *Cell Calcium*, 28(5-6): 285-296.

- Gunter, T. E., & Sheu, S. S. 2009. Characteristics and possible functions of mitochondrial Ca(2+) transport mechanisms. *Biochim Biophys Acta*, 1787(11): 1291-1308.
- Gunter, T. E., Yule, D. I., Gunter, K. K., Eliseev, R. A., & Salter, J. D. 2004. Calcium and mitochondria. *Febs Letters*, 567(1): 96-102.
- Guo, W. X., Pye, Q. N., Williamson, K. S., Stewart, C. A., Hensley, K. L., Kotake, Y., Floyd, R. A., & Broyles, R. H. 2005. Mitochondrial dysfunction in choline deficiency-induced apoptosis in cultured rat hepatocytes. *Free Radic Biol Med*, 39(5): 641-650.
- Gupta, G., Cases, J. A., She, L., Ma, X. H., Yang, X. M., Hu, M., Wu, J., Rossetti, L., & Barzilai, N. 2000. Ability of insulin to modulate hepatic glucose production in aging rats is impaired by fat accumulation. *American journal of physiology. Endocrinology and metabolism*, 278(6): E985-991.
- Halestrap, A. P. 2006. Calcium, mitochondria and reperfusion injury: a pore way to die. *Biochem Soc Trans*, 34(Pt 2): 232-237.
- Harris, T. B. 2002. Invited commentary: body composition in studies of aging: new opportunities to better understand health risks associated with weight. *American journal of epidemiology*, 156(2): 122-124; discussion 125-126.
- Hassanein, T., & Frederick, T. 2004. Mitochondrial dysfunction in liver disease and organ transplantation. *Mitochondrion*, 4(5-6): 609-620.
- Hebbard, L., & George, J. 2011. Animal models of nonalcoholic fatty liver disease. *Nature reviews. Gastroenterology & hepatology*, 8(1): 35-44.
- Hengartner, M. O. 2000. The biochemistry of apoptosis. *Nature*, 407(6805): 770-776.
- Ji, L. L. 2007. Antioxidant signaling in skeletal muscle: a brief review. *Exp Gerontol*, 42(7): 582-593.
- Johannsen, D. L., & Ravussin, E. 2009. The role of mitochondria in health and disease. *Curr Opin Pharmacol*, 9(6): 780-786.
- Kamo, N., Muratsugu, M., Hongoh, R., & Kobatake, Y. 1979. Membrane potential of mitochondria measured with an electrode sensitive to tetraphenyl phosphonium and relationship between proton electrochemical potential and phosphorylation potential in steady state. *The Journal of membrane biology*, 49(2): 105-121.
- Katz, K. D., Curry, S. C., Brooks, D. E., & Gerkin, R. D. 2004. The effect of cyclosporine A on survival time in salicylate-poisoned rats. *The Journal of emergency medicine*, 26(2): 151-155.
- Khand, F. D., Gordge, M. P., Robertson, W. G., Noronha-Dutra, A. A., & Hothersall, J. S. 2002. Mitochondrial superoxide production during oxalate-mediated oxidative stress in renal epithelial cells. *Free Radic Biol Med*, 32(12): 1339-1350.
- Kireev, R. A., Tresguerres, A. C., Castillo, C., Salazar, V., Ariznavarreta, C., Vara, E., & Tresguerres, J. A. 2007. Effect of exogenous administration of melatonin and growth hormone on pro-antioxidant functions of the liver in aging male rats. *Journal of pineal research*, 42(1): 64-70.
- Labbe, G., Pessayre, D., & Fromenty, B. 2008. Drug-induced liver injury through mitochondrial dysfunction: mechanisms and detection during preclinical safety studies. *Fundam Clin Pharmacol*, 22(4): 335-353.
- Lawen, A. 2003. Apoptosis-an introduction. *Bioessays*, 25(9): 888-896.

- Lee, K., Sung, J. A., Kim, J. S., & Park, T. J. 2009. The roles of obesity and gender on the relationship between metabolic risk factors and non-alcoholic fatty liver disease in Koreans. *Diabetes Metab Res Rev*, 25(2): 150-155.
- Lim, J. S., Mietus-Snyder, M., Valente, A., Schwarz, J. M., & Lustig, R. H. 2010. The role of fructose in the pathogenesis of NAFLD and the metabolic syndrome. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*, 7(5): 251-264.
- Liu, J., Yeo, H. C., Overvik-Douki, E., Hagen, T., Doniger, S. J., Chyu, D. W., Brooks, G. A., & Ames, B. N. 2000. Chronically and acutely exercised rats: biomarkers of oxidative stress and endogenous antioxidants. *Journal of applied physiology*, 89(1): 21-28.
- Lyon, A. R., Joudrey, P. J., Jin, D., Nass, R. D., Aon, M. A., O'Rourke, B., & Akar, F. G. 2010. Optical imaging of mitochondrial function uncovers actively propagating waves of mitochondrial membrane potential collapse across intact heart. *Journal of molecular and cellular cardiology*, 49(4): 565-575.
- Mannella, C. A. 2006. Structure and dynamics of the mitochondrial inner membrane cristae. *Biochim Biophys Acta*, 1763(5-6): 542-548.
- Mather, M., & Rottenberg, H. 2000. Aging enhances the activation of the permeability transition pore in mitochondria. *Biochem Biophys Res Commun*, 273(2): 603-608.
- Molpeceres, V., Mauriz, J. L., Garcia-Mediavilla, M. V., Gonzalez, P., Barrio, J. P., & Gonzalez-Gallego, J. 2007. Melatonin is able to reduce the apoptotic liver changes induced by aging via inhibition of the intrinsic pathway of apoptosis. *The journals of gerontology. Series A, Biological sciences and medical sciences*, 62(7): 687-695.
- Monti, E., Prosperi, E., Supino, R., & Bottiroli, G. 1995. Free radical-dependent DNA lesions are involved in the delayed cardiotoxicity induced by adriamycin in the rat. *Anticancer research*, 15(1): 193-197.
- Moore, J. B. 2010. Non-alcoholic fatty liver disease: the hepatic consequence of obesity and the metabolic syndrome. *Proc Nutr Soc*, 69(2): 211-220.
- Mota, M. P., Figueiredo, P. A., & Duarte, J. A. 2004. Teorias biológicas do envelhecimento. *Revista Portuguesa de Ciências do Desporto*, 2004, vol. 4(n° 1): [81-110].
- Muthukumar, A., & Selvam, R. 1998. Role of glutathione on renal mitochondrial status in hyperoxaluria. *Mol Cell Biochem*, 185(1-2): 77-84.
- Nadtochiy, S. M., Tompkins, A. J., & Brookes, P. S. 2006. Different mechanisms of mitochondrial proton leak in ischaemia/reperfusion injury and preconditioning: implications for pathology and cardioprotection. *The Biochemical journal*, 395(3): 611-618.
- Nicholls, D. G. 2002. Mitochondrial function and dysfunction in the cell: its relevance to aging and aging-related disease. *The international journal of biochemistry & cell biology*, 34(11): 1372-1381.
- Oh, K. W., Qian, T., Brenner, D. A., & Lemasters, J. J. 2003. Salicylate enhances necrosis and apoptosis mediated by the mitochondrial permeability transition. *Toxicological sciences : an official journal of the Society of Toxicology*, 73(1): 44-52.
- Oliveira, C. P., Coelho, A. M., Barbeiro, H. V., Lima, V. M., Soriano, F., Ribeiro, C., Molan, N. A., Alves, V. A., Souza, H. P., Machado, M. C., & Carrilho, F. J. 2006. Liver mitochondrial dysfunction and oxidative stress in the pathogenesis

- of experimental nonalcoholic fatty liver disease. *Brazilian journal of medical and biological research = Revista brasileira de pesquisas medicas e biologicas / Sociedade Brasileira de Biofisica ... [et al.]*, 39(2): 189-194.
- Oliveira, P. J. 2011. Mitochondria as a drug target in health and disease. *Current drug targets*, 12(6): 761.
- Paradies, G., Petrosillo, G., Paradies, V., & Ruggiero, F. M. 2010. Oxidative stress, mitochondrial bioenergetics, and cardiolipin in aging. *Free Radic Biol Med*, 48(10): 1286-1295.
- Parini, P., Angelin, B., & Rudling, M. 1999. Cholesterol and lipoprotein metabolism in aging: reversal of hypercholesterolemia by growth hormone treatment in old rats. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*, 19(4): 832-839.
- Penna, C., Mancardi, D., Rastaldo, R., & Pagliaro, P. 2009. Cardioprotection: a radical view Free radicals in pre and postconditioning. *Biochim Biophys Acta*, 1787(7): 781-793.
- Pessayre, D., & Fromenty, B. 2005. NASH: a mitochondrial disease. *J Hepatol*, 42(6): 928-940.
- Pessayre, D., Mansouri, A., Berson, A., & Fromenty, B. 2010. Mitochondrial involvement in drug-induced liver injury. *Handb Exp Pharmacol*(196): 311-365.
- Pessayre, D., Mansouri, A., & Fromenty, B. 2002. Nonalcoholic steatosis and steatohepatitis. V. Mitochondrial dysfunction in steatohepatitis. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 282(2): G193-199.
- Portincasa, P., Grattagliano, I., Palmieri, V. O., & Palasciano, G. 2006. Current pharmacological treatment of nonalcoholic fatty liver. *Curr Med Chem*, 13(24): 2889-2900.
- Radak, Z., Chung, H. Y., & Goto, S. 2008. Systemic adaptation to oxidative challenge induced by regular exercise. *Free radical biology & medicine*, 44(2): 153-159.
- Rector, R. S., & Thyfault, J. P. 2011. Does physical inactivity cause nonalcoholic fatty liver disease? *Journal of applied physiology*, 111(6): 1828-1835.
- Rector, R. S., Thyfault, J. P., Laye, M. J., Morris, R. T., Borengasser, S. J., Uptergrove, G. M., Chakravarthy, M. V., Booth, F. W., & Ibdah, J. A. 2008a. Cessation of daily exercise dramatically alters precursors of hepatic steatosis in Otsuka Long-Evans Tokushima Fatty (OLETF) rats. *The Journal of physiology*, 586(Pt 17): 4241-4249.
- Rector, R. S., Thyfault, J. P., Morris, R. T., Laye, M. J., Borengasser, S. J., Booth, F. W., & Ibdah, J. A. 2008b. Daily exercise increases hepatic fatty acid oxidation and prevents steatosis in Otsuka Long-Evans Tokushima Fatty rats. *American journal of physiology. Gastrointestinal and liver physiology*, 294(3): G619-626.
- Reddy, P. H. 2008. Mitochondrial medicine for aging and neurodegenerative diseases. *Neuromolecular Medicine*, 10(4): 291-315.
- Repetto, M. G., Ossani, G., Monserrat, A. J., & Boveris, A. 2010. Oxidative damage: the biochemical mechanism of cellular injury and necrosis in choline deficiency. *Experimental and molecular pathology*, 88(1): 143-149.
- Rikans, L. E., & Hornbrook, K. R. 1997. Lipid peroxidation, antioxidant protection and aging. *Biochimica et biophysica acta*, 1362(2-3): 116-127.
- Rivera, C. A. 2008. Risk factors and mechanisms of non-alcoholic steatohepatitis. *Pathophysiology : the official journal of the International Society for Pathophysiology / ISP*, 15(2): 109-114.

- Rogge, M. M. 2009. The role of impaired mitochondrial lipid oxidation in obesity. *Biol Res Nurs*, 10(4): 356-373.
- Sastre, J., Pallardo, F. V., & Vina, J. 2003. The role of mitochondrial oxidative stress in aging. *Free Radic Biol Med*, 35(1): 1-8.
- Sastre, J., Serviddio, G., Pereda, J., Minana, J. B., Arduini, A., Vendemiale, G., Poli, G., Pallardo, F. V., & Vina, J. 2007. Mitochondrial function in liver disease. *Front Biosci*, 12: 1200-1209.
- Scherz-Shouval, R., & Elazar, Z. 2011. Regulation of autophagy by ROS: physiology and pathology. *Trends Biochem Sci*, 36(1): 30-38.
- Schmucker, D. L. 2005. Age-related changes in liver structure and function: Implications for disease ? *Experimental Gerontology*, 40(8-9): 650-659.
- Seidman, M. D., Khan, M. J., Bai, U., Shirwany, N., & Quirk, W. S. 2000. Biologic activity of mitochondrial metabolites on aging and age-related hearing loss. *American Journal of Otology*, 21(2): 161-167.
- Servais, H., Ortiz, A., Devuyst, O., Denamur, S., Tulkens, P. M., & Mingeot-Leclercq, M. P. 2008. Renal cell apoptosis induced by nephrotoxic drugs: cellular and molecular mechanisms and potential approaches to modulation. *Apoptosis*, 13(1): 11-32.
- Serviddio, G., Sastre, J., Bellanti, F., Vina, J., Vendemiale, G., & Altomare, E. 2008. Mitochondrial involvement in non-alcoholic steatohepatitis. *Mol Aspects Med*, 29(1-2): 22-35.
- Shirakata, Y., & Koike, K. 2003. Hepatitis B virus X protein induces cell death by causing loss of mitochondrial membrane potential. *The Journal of biological chemistry*, 278(24): 22071-22078.
- Skulachev, V. P. 2000. Mitochondria in the programmed death phenomena; a principle of biology: "it is better to die than to be wrong". *Iubmb Life*, 49(5): 365-373.
- Smaili, S. S., Hsu, Y. T., Carvalho, A. C., Rosenstock, T. R., Sharpe, J. C., & Youle, R. J. 2003. Mitochondria, calcium and pro-apoptotic proteins as mediators in cell death signaling. *Braz J Med Biol Res*, 36(2): 183-190.
- Speliotes, E. K. 2009. Genetics of Common Obesity and Nonalcoholic Fatty Liver Disease. *Gastroenterology*, 136(5): 1492-1495.
- Starkov, A. A., Fiskum, G., Chinopoulos, C., Lorenzo, B. J., Browne, S. E., Patel, M. S., & Beal, M. F. 2004. Mitochondrial alpha-ketoglutarate dehydrogenase complex generates reactive oxygen species. *J Neurosci*, 24(36): 7779-7788.
- Tappy, L., & Le, K. A. 2010. Metabolic effects of fructose and the worldwide increase in obesity. *Physiol Rev*, 90(1): 23-46.
- Thyfault, J. P., Rector, R. S., Uptergrove, G. M., Borengasser, S. J., Morris, E. M., Wei, Y., Laye, M. J., Burant, C. F., Qi, N. R., Ridenhour, S. E., Koch, L. G., Britton, S. L., & Ibdah, J. A. 2009. Rats selectively bred for low aerobic capacity have reduced hepatic mitochondrial oxidative capacity and susceptibility to hepatic steatosis and injury. *The Journal of physiology*, 587(Pt 8): 1805-1816.
- Trost, L. C., & Lemasters, J. J. 1997. Role of the mitochondrial permeability transition in salicylate toxicity to cultured rat hepatocytes: implications for the pathogenesis of Reye's syndrome. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 147(2): 431-441.
- Tsujimoto, Y., Nakagawa, T., & Shimizu, S. 2006. Mitochondrial membrane permeability transition and cell death. *Biochim Biophys Acta*, 1757(9-10): 1297-1300.

- Wallace, D. C. 1999. Mitochondrial diseases in man and mouse. *Science*, 283(5407): 1482-1488.
- Wallace, D. C., Brown, M. D., Melov, S., Graham, B., & Lott, M. 1998. Mitochondrial biology, degenerative diseases and aging. *Biofactors*, 7(3): 187-190.
- Wallace, D. C., Shoffner, J. M., Trounce, I., Brown, M. D., Ballinger, S. W., Corral-Debrinski, M., Horton, T., Jun, A. S., & Lott, M. T. 1995. Mitochondrial DNA mutations in human degenerative diseases and aging. *Biochimica et biophysica acta*, 1271(1): 141-151.
- Zeeh, J. 2001. The aging liver: consequences for drug treatment in old age. *Archives of Gerontology and Geriatrics*, 32(3): 255-263.
- Zeisel, S. H., & da Costa, K. A. 2009. Choline: an essential nutrient for public health. *Nutrition Reviews*, 67(11): 615-623.